


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



L. Michaelis



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Berlin, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. E., **C. von Noorden**-Wien, **E. Salkowski**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin.

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Siebzehnter Band.

Mit 3 Tafeln.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1909.

Druck von Oscar Brandstetter, Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Über die Verteilung des Zuckers im Blut.

Von

Adolf Hollinger.

(Aus der medizinischen Klinik des städtischen Krankenhauses und dem chemisch-physiologischen Institut der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 4. März 1909.)

Im vorigen Jahre veröffentlichte ich eine größere Reihe von Blutzuckerbestimmungen an fiebernden Kranken.[1]) Ich stellte fest, daß — unter Zugrundelegung der von Liefmann und Stern[2]) für den normalen Menschen ermittelten und von Weiland[3]) sowie auch von mir[4]) bestätigten Blutzuckerwerte — in fast allen Fällen die fieberhafte Temperatursteigerung von einem abnorm hohen Blutzuckergehalt begleitet war. Für einige Fälle von Pneumonie war bereits früher von Liefmann und Stern Hyperglykämie nachgewiesen worden.

Sowohl die Zuckerbestimmungen der eben genannten Autoren wie auch meine Untersuchungen wurden am Gesamtblut ausgeführt, die Verteilung des Zuckers auf Blutplasma und die geformten Bestandteile blieb dabei unberücksichtigt.

Es lag nunmehr nahe, diese Verhältnisse bei normalem und namentlich auch bei krankhaft verändertem Blutzuckergehalt zu untersuchen. Denn nur so konnten Aufschlüsse über

---

[1]) Hollinger, Über Hyperglykämie bei Fieber. Arch. f. klin. Med. 92, 217.

[2]) Liefmann und Stern, Über Glykämie und Glykosurie. Diese Zeitschr. 1, 299, 1906.

[3]) Weiland, Über den Einfluß ermüdender Muskelarbeit auf den Blutzuckergehalt. Arch. f. klin. Med. 92, 223, 1908.

[4]) l. c.

die Rolle, welche die geformten Blutbestandteile für den Zuckertransport von Organ zu Organ spielen, gewonnen werden.

Den äußeren Anlaß zu der vorliegenden Arbeit gab eine Mitteilung von Bönniger[1]) über einen Fall von Nierendiabetes, in der dieser Autor die Anschauung ausspricht, daß es ein Fehler sei, „das Gesamtblut auf seinen Zuckergehalt zu untersuchen, denn den größten Teil enthält das Serum — vor allem bei Diabetes". Bönniger weist dann auf das namentlich unter pathologischen Zuständen sehr schwankende Mengenverhältnis zwischen Volumen des Plasmas und der Blutkörperchen hin und kommt zu dem Schluß, „daß alle Zuckerbestimmungen, welche am Gesamtblut vorgenommen wurden, mit größter Vorsicht aufzunehmen sind".

Die Bedenken Bönnigers wären dann gerechtfertigt, wenn die Blutkörperchen entweder überhaupt zuckerfrei wären oder doch an den Schwankungen des Blutzuckergehalts sich in keiner Weise beteiligten. Beteiligen sie sich aber an diesen Schwankungen, d. h. findet ein dauernder Austausch von Zucker zwischen Blutflüssigkeit und Blutkörperchen statt, so wäre es völlig verfehlt, Bestimmungen des Blutzuckers auf das Serum zu beschränken, und es würden die von Bönniger gegen die Zuckerbestimmungen am Gesamtblut erhobenen prinzipiellen Bedenken jeglicher Begründung entbehren.

Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich daher mit der Frage, wie sich der Blutzucker auf die Blutflüssigkeit und die geformten Bestandteile bei normalem und krankhaft verändertem Blutzuckergehalt verteilt. Als meine Untersuchungen schon bis zu einem gewissen Abschluß gekommen waren, erschien eine Veröffentlichung von Rona und Michaelis[2]), welche sich ebenfalls mit der Verteilung des Zuckers auf Blutflüssigkeit und -körperchen beschäftigt. Rona und Michaelis bestimmten den Zuckergehalt im Gesamtblute, im Plasma und in den durch Zentrifugierung und Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung vom Serum möglichst befreiten Blutkörperchen. Sie gelangen zu dem Resultat, „daß die Blutkörperchen

[1]) Bönniger, Beitrag zur Frage des Nierendiabetes. Deutsche med. Wochenschr. 1908, 780.

[2]) Rona und Michaelis, Untersuchungen über den Blutzucker. V. Der Zuckergehalt der Blutkörperchen. Diese Zeitschr. 16, 60, 1909.

Traubenzucker in erheblichen Mengen enthalten, der Gehalt des Serums und der Blutkörperchen an Zucker ist manchmal fast gleich, in anderen Fällen sehr deutlich verschieden".

Diese Ergebnisse wurden am normalen Hundeblut gewonnen, doch heben Rona und Michaelis hervor, daß es jetzt nahe läge, „die Schwankungen des Blutkörperchenzuckers unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen zu studieren".

Meine Untersuchungen wurden in der Art ausgeführt, daß ich gleichzeitige Zuckerbestimmungen im Gesamtblut und in dem durch Zentrifugierung des defibrinierten Blutes gewonnenen Serum vornahm. Direkte Bestimmungen des Blutkörperchenzuckers, wie Rona und Michaelis sie ausführten, habe ich nicht vorgenommen, doch dürften derartige Bestimmungen kaum ohne wesentliche Fehler durchzuführen sein, wie auch aus den Angaben von Rona und Michaelis hervorgeht.

Im einzelnen gestaltete sich die Ausführung der Bestimmungen folgendermaßen: Das durch Venaepunktion entnommene Blut wurde zum Teil in einem mit einer bestimmten Menge Salzsäurelösung von 2°/₀ und Wasser beschickten Meßkolben aufgefangen, genau in der Weise, wie es in der oben erwähnten Arbeit von Liefmann und Stern angegeben ist. Ein anderer Teil des Blutes wurde in einen Meßzylinder gelassen, mit dem Glasstabe defibriniert und möglichst rasch mittels einer Wasserzentrifuge zentrifugiert. Sowohl das Gesamtblut wie das Serum wurden in der von Schenck beschriebenen Weise gefällt. Vor dem Zusatze der Sublimatlösung enthielt also das Blut die seinem Volumen gleiche Menge Wasser und die doppelte Menge von 2°/₀iger Salzsäure. Hierbei werden naturgemäß die Blutkörperchen aufgelöst, und es ist eine irrige Annahme von Rona und Michaelis, daß die Methode von Schenck es vermeidet, „den Inhalt der Blutkörperchen vor der Enteiweißung in Lösung zu bringen". Vielmehr werden die Blutkörperchen bei der Schenckschen Methode ebenso vollständig „ausgelaugt" wie bei dem von Rona und Michaelis geübten Verfahren.

Die Weiterverarbeitung geschah ganz in der früher geschilderten Weise: Nach der Entquecksilberung des durch Absaugen auf der Nutsche gewonnenen Filtrates mit Schwefelwasserstoff, der Vertreibung des Schwefelwasserstoffs durch

einen Luftstrom, der Abtrennung des Sulfidniederschlages durch Filtration und der Abmessung eines aliquoten Teiles des Filtrates wurde mit Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und im Vakuum bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur des Heizwassers auf ein kleines Volumen eingeengt. Die Flüssigkeit wurde in einem Meßkölbchen auf 50 ccm aufgefüllt und mit starker Natronlauge bis zur eben alkalischen Reaktion versetzt. Nach Entfernung des hierbei ausgeschiedenen Phosphatniederschlages wurde eine völlig klare und farblose Flüssigkeit erhalten. Auch beim Einengen auf ein sehr wesentlich kleineres Volumen werden völlig farblose oder höchstens ganz schwach gelbstichige Flüssigkeiten erhalten, deren polarimetrische Untersuchung keinerlei Schwierigkeit bietet, wenn auch der höhere Kochsalzgehalt der nach Schenck gewonnenen Blutextrakte keine so weitgehende Einengung wie die verschiedenen Verfahren von Rona und Michaelis gestattet. Die Titration nach Knapp wurde genau wie bei den früheren Versuchen in der von Embden[1]) beschriebenen Weise ausgeführt.

Außer der Titration nach Knapp wurden in einer Reihe von Fällen auch Bestimmungen nach einem modifizierten Lehmannschen Verfahren vorgenommen.[2])

Ich werde im folgenden diese Bestimmung kurz als jodometrische bezeichnen. —

Bei der Besprechung der Ergebnisse meiner Untersuchungen sollen diejenigen Fälle vorausgeschickt werden, in denen sich der Zuckergehalt des Gesamtblutes, nach Knapp bestimmt, als normal erwies, d. h. sich nicht über 0,105 % erhob.[3])

Aus Kolonne 5 dieser in Tabelle I aufgeführten Fälle geht der nach Knapp bestimmte Zuckergehalt des Gesamtblutes, aus Kolonne 7 der mittels der gleichen Methode gewonnene Zuckerwert des Serums hervor. In 5 von den 8 an 7 verschiedenen Personen vorgenommenen Bestimmungen (Nr. 1, 2, 3, 6 und 8 der Tabelle I) ist der Zuckergehalt des Gesamt-

---

[1]) G. Embden, Über Zuckerbildung bei künstlicher Durchblutung der glykogenfreien Leber. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 44, 1904.

[2]) Über die Brauchbarkeit und die technische Ausführung dieses seit vielen Jahren im hiesigen Laboratorium üblichen, äußerst einfachen Verfahrens soll demnächst von anderer Seite besonders berichtet werden.

[3]) Liefmann und Stern, l. c. S. 302.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nr.	Name, Alter	Krankheit	Temperatur z. Zt. d. Blutentnahme	Zuckergehalt des Gesamtblutes in %		Zuckergehalt des Serums in %		Bemerkungen
				nach Knapp	jodometrisch	nach Knapp	jodometrisch	
1	Gr. 40 J.	Chron. interst. Nephritis	normal	0,080	—	0,082	—	
2	Ders.	"	"	0,082	—	0,083	—	8 Tage später
3	He. 44 J.	Tabes dors.	"	0,078	—	0,079	—	
4	Jö. 58 J.	Bronchiektasen	"	0,077	—	0,086	—	
5	Ge. 24 J.	Gesund	"	0,104	—	0,093	0,107	
6	Wi. 23 J.	Eklampsie	"	0,101	0,124	0,101	—	Der Aderlaß wurde $2^1/_2$ Std. post partum gemacht, nachdem in dieser Zeit 3 eklampt. Anfälle vorausgegangen waren
7	Mü. 33 J.	Neurasth.	"	0,084	0,093	0,078	0,085	
8	Se. 35 J.	Pneumonie	38,5°	0,104	0,131	0,105	0,129	Pat. war zur Zeit der Venaesectio moribund, die Temp. bewegte sich vorher um 38,5° herum und war nur einmal auf 39,2° gestiegen

blutes entweder völlig identisch oder die Unterschiede liegen innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung. Die in den drei übrigen Versuchen (Nr. 4, 5 und 7) zutage tretenden Differenzen sind ziemlich geringfügig, in Versuch 4 ist das Serum, in 5 und 7 das Gesamtblut ein wenig reicher an Zucker. Es ist schwer zu entscheiden, ob diese kleinen Differenzen wirklich einer verschiedenen Verteilung des Zuckers auf die Blutkörperchen und das Plasma im zirkulierenden Blute entsprechen oder ob es während der Zentrifugierung des Blutes, welche immerhin

$1^1/_2$ bis 2 Stunden in Anspruch nahm, zu einer nachträglichen geringfügigen Veränderung des Blutzuckergehaltes gekommen ist.[1])

Jedenfalls ergibt sich aus der Tabelle I die Tatsache, daß bei normalem Blutzuckergehalt sich die für das Gesamtblut und das Serum ermittelten Zuckerwerte gar nicht oder nur um ein geringes unterscheiden. Eine solche völlige oder annähernde Gleichheit des Zuckergehaltes des Gesamtblutes und des Serums ist natürlich nur dann möglich, wenn sich der Zucker völlig oder annähernd gleichmäßig auf das Serum und die Blutkörperchen verteilt.

Neben den Bestimmungen nach Knapp wurden in sechs Fällen Bestimmungen nach der jodometrischen Methode angestellt. In allen diesen Fällen waren die gewonnenen Werte ganz merklich höher als die nach Knapp ermittelten. Da die Methode ebenso wie die Knappsche unter den von uns gewählten Bedingungen an reinen Zuckerlösungen sich in vielfältigen Versuchen als ein Verfahren von ganz besonderer Genauigkeit erwiesen hat, müssen die beobachteten Differenzen zwischen beiden Methoden entweder durch Bestandteile der titrierten Blutextrakte bedingt sein, welche die Reduktion der Knappschen und die der Fehlingschen Lösung durch Traubenzucker in ungleicher Weise beeinflussen, oder es müssen verschiedene die Knappsche und die Fehlingsche Lösung in ungleicher Weise ruduzierende Substanzen vorhanden sein.

Wie bereits erwähnt, bewegen sich die in Tabelle I niedergelegten mit der Knappschen Methode gefundenen Zuckerwerte innerhalb der normalen Grenzen, d. h. der höchste ermittelte Wert beträgt 0,105 °/₀ (Versuch 8, Kolonne 7). Die mittels der jodometrischen Methode gewonnenen Zahlen überschreiten diesen oberen Grenzwert zum Teil ganz erheblich, so in Versuch 6 Kolonne 6: 0,124 °/₀, ferner in Versuch 8 Kolonne 6 und 8: 0,131 °/₀ und 0,129 °/₀.

Diese Werte würden, nach Knapp erhalten, eine nicht unerhebliche Hyperglykämie bedeuten. Welche Werte als die richtigeren anzusehen sind, darüber dürfte eine Entscheidung nicht ohne weiteres zu treffen sein.

[1]) Besondere zur Entscheidung dieser Frage angestellte Versuche haben bisher zu keinem endgültigen Urteil geführt.

Von der Tatsache, daß die Reduktion der Fehlingschen Lösung durch den „Blutzucker“ merklich stärker sein kann als diejenige der Knappschen Flüssigkeit, habe ich mich noch an fünf weiteren Bestimmungen an Blut mit normalem Zuckergehalt überzeugt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt und ohne weiteres verständlich.

Tabelle II.

Nr.	Name, Alter	Krankheit	Temper. zur Zeit der Blutentnahme	Zuckergehalt des Gesamtblutes in %		Bemerkungen
				nach Knapp	jodometrisch	
9	Ni. 37 J.	Tub. pulmonum	normal	0,089	0,100	
10	Be. 17 J.	Nierendiabetes?	„	0,086	0,098	
11	Le. 36 J.	Lumbago	„	0,082	0,100	
12	Dr. Holl. 31 J.	Gesund	„	0,074	0,081	
13	Ders.	„	„	0,068	0,076	Nach 3 Gemüsetagen

Jedenfalls ist es also nötig, wenn man vergleichende Untersuchungen über den Blutzuckergehalt anstellen will, stets dieselbe Titrationsmethode zu verwenden und sich bewußt zu sein, daß die gewonnenen Zahlen eben nur Vergleichszahlen sind, die uns wohl über Schwankungen des Blutzuckergehalts unter normalen und pathologischen Zuständen sehr gut orientieren können; ein genauer Aufschluß über die absoluten Zuckermengen im Blute wird erst dann zu erreichen sein, wenn es möglich sein wird, die verschiedenen vielleicht im Blute vorhandenen Zuckerarten nebeneinander zu bestimmen.

Wie verteilt sich nun der Blutzucker auf Blutkörperchen und Blutflüssigkeit bei krankhaft gesteigertem Blutzuckergehalt? Über diese Frage habe ich Untersuchungen an 13 verschiedenen Patienten angestellt (Tabelle III).

Die Ursache der Hyperglykämie war in diesen Fällen eine verschiedenartige. Bei Nr. 14 handelte es sich um einen an Diabetes mellitus leidenden Patienten, in dessen Harn zur Zeit

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nr.	Name, Alter	Krankheit	Temperatur z. Zt. d. Blutentnahme	Zuckergehalt des Gesamtblutes in %		Zuckergehalt des Serums in %		Bemerkungen
				nach Knapp	jodometrisch	nach Knapp	jodometrisch	
14	Scho. 52 J.	Diabetes mell. u. Chron. int. Nephr.	normal	0,194	—	0,180	—	Urin zur Zeit des Aderlasses zuckerfrei
15	Li. 67 J.	Arterioscler., Myodey. cordis, Bronchitis Diabetes mell.?	„	0,139	—	0,149	—	Urin zur Zeit der Blutentnahme zuckerfrei; 3 Tage vorher und am folgenden Tage Zuckerproben positiv
16	Po. 36 J.	Apoplexie, chron. int. Nephritis	„	0,123	—	0,106	—	Keine Glykosurie
17	Ge. 56 J.	Apoplexie, chron. int. Nephritis	„	0,308	—	0,288	—	Glykosurie
18	Fro. 35 J.	Chron. int. Nephritis, Urämie	„	0,116	0,119	—	0,121	Kein Zucker im Urin
19	Kna. 21 J.	Eklampsie	„	0,112	0,128	0,083	—	Abends vorher entbunden, danach 3 eklampt. Anfälle
20	Eu. 32 J.	Enures. noct.	„	0,133	—	0,112	—	
21	Kl. 66 J.	Pneumonie beider Unterlappen	39,6°	0,191	—	0,168	—	Fieber seit 7 Tagen
22	Ste. 36 J.	Pneumonie (r. Unterlappen)	40,2°	0,184	0,170	0,164	0,177	Fieber seit 5 Tagen. 5 Tage n. d. Krisis betrug d. Zuckergeh. des Serums 0,095 %
23	Glü. 18 J.	Erysip. faciei	39,9°	0,113	0,116	0,102	—	Fieber seit 12 Stunden
24	Heu. 28 J.	Pneumonie	39,4°	0,118	0,120	0,109	—	Fieber seit nicht ganz 2 Tagen
25	Eu. 24 J.	Pneumonie	40,4°	0,115	0,128	0,126	0,136	Seit 2 Tagen Fieber.
	„	„	39,6°	—	—	0,122	0,149	4 Tage später; Pat. moribund
25	Pa. 18 J.	Pneumonie	39,8°	0,157	0,171	0,166	0,185	Der Aderlaß wurde am 5. Tag der Continua vorgenommen

des Aderlasses Zucker nicht nachweisbar war, bei Nr. 15 hatte wenige Tage vor und am Tage nach der Blutentnahme Glykosurie bestanden, auch hier war aber im Augenblick der Venaepunktion Zucker im Harn nicht nachweisbar. Die Patienten, an denen die Bestimmungen 16 und 17 vorgenommen wurden, waren kurze Zeit vorher auf der Basis einer bestehenden chronischen interstitiellen Nephritis von schweren apoplektischen Insulten betroffen worden. Bei dem unter 16 aufgeführten Patienten war nach dem Insult keine Glykosurie aufgetreten, während in dem folgenden Falle bei bestehender Inkontinenz in der geringen aufgefangenen Urinmenge Zucker nachgewiesen werden konnte.[1]) Bei der Bestimmung 18 handelte es sich um einen Patienten mit chronischer interstitieller Nephritis, bei dem der Aderlaß wegen des Bestehens einer urämischen Dyspnoe vorgenommen wurde. Die in der Tabelle folgende Patientin hatte am Tage vor der Blutentnahme im unmittelbaren Anschluß an die Entbindung mehrere eklamptische Anfälle durchgemacht. Der Patient, an dem die Bestimmung 20 ausgeführt wurde, war ein wegen Enuresis nocturna in das Krankenhaus aufgenommener Erwachsener mit augenscheinlich neuropathischer Konstitution. Während seines Aufenthalts im Krankenhaus wurde Glykosurie nicht beobachtet.

In den bisher besprochenen sieben Fällen von Hyperglykämie handelte es sich um nicht fiebernde Patienten, während die in den sechs folgenden Fällen vorhandene Hyperglykämie als febrile Hyperglykämie im Sinne meiner früheren Arbeit aufzufassen ist. Die notwendigen Einzelangaben über diese Patienten sind in der Tabelle enthalten.

Wenn wir zunächst nur die nach der Knappschen Methode erhaltenen Zahlen berücksichtigen, so geht aus den Kolonnen 5 und 7 hervor, daß in sämtlichen nach diesem Verfahren untersuchten zwölf Fällen der Zuckergehalt des Gesamtblutes und des Serums merklich verschieden war; in neun Fällen (Nr. 14, 16, 17, 19 bis 24) ist der Zuckergehalt im Serum niedriger,

---

[1]) In einem dritten Fall von Apoplexie bei chronischer interstitieller Nephritis, in dem ich mich auf eine Zuckerbestimmung im Gesamtblut beschränken mußte, fand ich bei einer bestehenden Glykosurie von 1,6% ebenfalls eine hochgradige Hyperglykämie (0,201% nach Knapp und 0,219% jodometrisch).

in drei Fällen (Nr. 15, 25, 26) ist er höher als der des Gesamtblutes. Die gefundenen Differenzen liegen wohl in allen Fällen außerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung.

In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle sind demnach die Blutkörperchen stärker an der Hyperglykämie beteiligt als die Blutflüssigkeit, in der Minderzahl schwächer. Ohne allen Zweifel sind also auch an der krankhaften Steigerung des Blutzuckergehaltes die Blutkörperchen in hervorragender Weise beteiligt, in der Mehrzahl der von mir untersuchten Fälle stärker als das Serum. Unter diesen Umständen wäre es sicher verkehrt, wie Bönniger will, die Zuckerbestimmungen auf das Serum zu beschränken.[1])

In einem Falle (Nr. 18) liegt eine Zuckerbestimmung nach Knapp nur für das Gesamtblut vor, das aus Kolonne 6 und 8 ersichtliche Ergebnis der jodometrischen Methode zeigt aber, daß in diesem Falle der Gehalt der Blutkörperchen und des Serums an Zucker nahezu gleich war. Im übrigen ist auch in diesen Fällen von Hyperglykämie das Resultat der jodometrischen Zuckerbestimmung in einem Teil der Fälle dem nach Knapp gewonnenen sehr ähnlich, so bei Nr. 18: im Gesamtblut 0,116⁰/₀ nach Knapp und 0,119⁰/₀ jodometrisch; bei Nr. 22: im Gesamtblut 0,113⁰/₀ nach Knapp und 0,116⁰/₀ jodometrisch; bei Nr. 23: im Gesamtblut 0,118⁰/₀ und 0,120⁰/₀ jodometrisch.

Wenn man auf die in diesen drei Fällen zutage tretenden Unterschiede überhaupt Gewicht legen will, so sind auch hier die mit der jodometrischen Methode gewonnenen Werte etwas höher als nach Knapp. Ganz deutlich tritt eine derartige Differenz zutage bei der Bestimmung am Gesamtblut von Nr. 19, am Serum von Nr. 22, sowie namentlich im Gesamtblut und

---

[1]) Die bereits oben erwähnte Anschauung Bönnigers, daß es ein Fehler sei, das Gesamtblut auf seinen Zuckergehalt zu untersuchen, vor allem beim Diabetes, ist übrigens um so schwerer verständlich, als dieser Autor selbst an der Hand gleichzeitiger Zuckerbestimmung am Gesamtblut und im Serum und unter Berücksichtigung des nach der Methode von Bleibtreu bestimmten Blutkörperchenvolumens zu dem Resultat gelangt, „daß zuweilen der Gehalt der roten Blutkörperchen an reduzierender Substanz nicht viel geringer, in einzelnen Fällen sogar höher ist wie der des Serums".

im Serum von Nr. 25. Hier liegen die Unterschiede zum Teil weit außerhalb der Fehlergrenzen der beiden Bestimmungsmethoden, und es scheint aus diesem Verhalten mehr noch als aus den bei normalem Blutzuckergehalt mittels beider Methoden gewonnenen Vergleichswerten hervorzugehen, daß im Blute außer dem Traubenzucker eine andere reduzierende voraussichtlich kohlenhydratartige Substanz vorhanden sein kann, welche die Fehlingsche Lösung stärker als die Knappsche reduziert.

Von sämtlichen 23 am normal und abnorm zuckerhaltigen Blute nach der Knappschen und der jodometrischen Methode ausgeführten Vergleichsbestimmungen fällt nur eine aus der Reihe (Nr. 6, Bestimmung am Gesamtblut). Ob es sich hier um einen Titrationsfehler handelt oder nicht, wage ich nicht zu entscheiden.

Die wesentlichsten Ergebnisse der vorliegenden ausschließlich an Menschen angestellten Untersuchungen sind folgende:

1. Bei normalem Blutzuckergehalt sind Blutplasma und geformte Bestandteile entweder völlig oder annähernd gleich zuckerhaltig.

2. In der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Fälle von Hyperglykämie waren die Blutkörperchen stärker, in der Minderzahl schwächer als das Serum an dem abnorm hohen Zuckergehalt beteiligt.

Die Blutkörperchen verhalten sich also bei den Schwankungen des Blutzuckergehalts keineswegs wie unbeteiligte Fremdkörper, sondern sie nehmen an diesen Schwankungen durchaus teil.

3. Unter diesen Umständen ist es also nicht, wie Bönniger meint, ein Fehler, das Gesamtblut auf seinen Zuckergehalt zu untersuchen, sondern — theoretisch und praktisch — das Nächstliegende und Wichtigste.

Dabei soll keineswegs verkannt werden, daß neben der Zuckerbestimmung im Gesamtblut auch diejenige im Serum und, falls sich eine solche einwandfrei durchführen läßt, in den Blutkörperchen unter Umständen wichtige Aufschlüsse geben kann.

4. In der Mehrzahl der untersuchten Fälle wurde die alkalische Quecksilberlösung nach Knapp schwächer reduziert als

die alkalische Kupferlösung nach Fehling, trotzdem beide Methoden an reinen Traubenzuckerlösungen von bekanntem Gehalt und bei den in Frage kommenden Konzentrationen völlig einwandfreie Resultate liefern. Hierin ist vielleicht ein Hinweis darauf gegeben, daß sich im Blute außer dem Traubenzucker noch ein anderes reduzierendes Kohlenhydrat findet.

5. Eine titrimetrische Methode, den absoluten Zuckergehalt des Blutes festzustellen, besitzen wir demnach einstweilen nicht.

Vergleichende Blutzuckerbestimmungen müssen daher stets mittels derselben Titrationsmethode ausgeführt werden.

Dementsprechend gelten die von Liefmann und Stern ermittelten Normalwerte des Blutzuckers nur bei Anwendung der Knappschen Methode; ebenso sind auch unsere früheren Angaben über Hyperglykämie ausschließlich auf diese Methode zu beziehen.

Über die zerstörende Wirkung der Galle auf Toxine und Antitoxine bei Belichtung.

Von

Walther Hausmann und Ernst Pribram.

(Aus dem physiologischen Institut der Hochschule für Bodenkultur und dem staatl. serotherapeutischen Institut in Wien.)

(Eingegangen am 2. März 1909.)

C. W. Vogel ist es im Jahre 1873 gelungen, Substanzen zu finden, welche die Fähigkeit haben, photographische Platten für Strahlen von Wellenlängen empfindlich zu machen, für die sie vorher wenig oder gar nicht empfindlich waren. Es sind dies die sogenannten Sensibilisatoren der photographischen Technik. Eine andere Art der Sensibilisation haben uns Hermann v. Tappeiner und seine Schüler in der photodynamischen Wirkung fluorescierender Substanzen kennen gelehrt.

Vor kurzem konnte Hausmann nachweisen, daß sich solche Substanzen in der Pflanze wie im Tierkörper finden. Es konnte gezeigt werden, daß Chlorophyll und chlorophyllhaltige Extrakte grüner Pflanzen intensiv sensibilisierend im Sinne von Tappeiner auf Blutkörperchen und Paramaecien einwirken, und daß man durch tierische Galle und Hämatoporphyrin ebenfalls photodynamische Wirkung auf Erythrocyten und Paramaecien ausüben kann. Hierdurch war nachgewiesen, daß der tierische Organismus ebenso wie die Pflanzen Substanzen enthält, welche die Fähigkeit haben, die strahlende Energie des Lichtes in eine andere Energieform umzusetzen.[1])

In der vorliegenden Mitteilung soll über die Entgiftung von Toxinen und die Abschwächung von Antitoxinen durch

---

[1]) Diese Zeitschr. 12, 331, 1908; 14, 275, 1908; 15, 12, 1908.

einen Sensibilisator des Tierkörpers berichtet werden. Wir sind zuerst diesem Vorgange näher getreten, weil die Untersuchungen v. Tappeiners und Jodlbauers[1]) über die Einwirkung photodynamisch wirkender Stoffe auf Toxine und Antitoxine eine Untersuchung der Frage aussichtsreich erscheinen ließen, ob man auch durch dem Tierkörper entstammende Energieüberträger Toxine und Antitoxine unwirksam machen könne. Es erschien dies besonders darum interessant, weil eine solche Einwirkung unter Umständen auch im tierischen Organismus eine Rolle spielen könnte.

Bevor wir auf unser eigentliches Thema eingehen, möchten wir noch einige Bemerkungen über die sensibilisierende Wirkung der Galle auf Erythrocyten, die sich zum Teil auf eine frühere Arbeit Hausmanns beziehen,[2]) hier einfügen, um hierdurch einige Hinweise auf die photodynamische Wirkung der Galle überhaupt zu geben.

Bei unseren Beobachtungen untersuchten wir vorerst, inwiefern die Wärmestrahlen bei dieser Wirkung beteiligt seien. Zu diesem Zwecke schickten wir die Strahlen einer Bogenlampe von ca. 30 bis 40 Amp. durch ein Wasserfilter von 10 cm Dicke, hierauf durch eine 9 cm dicke Schicht von mit Salzsäure angesäuerter 7°/$_0$iger Lösung von Eisensulfat (vgl. v. Tappiner u. Jodlbauer)[3]). Die Eprouvetten selbst standen in Bechergläsern, die mit Wasser gefüllt waren. Bei allen Versuchen trat gleichmäßig die photodynamische Wirkung der Galle auf rote Blutkörperchen ein. Es wurden untersucht Rinder-, Schweine- und Kaninchengalle. — Beobachtungen von Hausmann und Kolmer haben neuerdings gezeigt, daß man diesen Nachweis auch mittels Paramaecien führen könne. Allerdings macht sich hier die Toxizität der Galle sehr störend bemerkbar, und die Resultate sind dadurch schwankend. Deshalb haben wir in diesen Untersuchungen lediglich rote Blutkörperchen verwendet.

---

[1]) A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 17, 51.

[2]) Diese Zeitschr. 14, 275, 1908 u. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 44.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, Bd. 3, 3035, 1903 und Münch. med. Wochenschr. 51, 737, 1904; vgl. auch S. Schmidt-Nielsen, Mitteilungen aus Finsens Med. Lysinst. 9, 233, 1905.

Weiter wurde festgestellt, daß nicht etwa unter Einwirkung des Lichtes aus der Galle ein Körper entsteht, der auf Blutkörperchen, die ebenfalls durch das Licht geschädigt sind, stärker wirkt, als dies bei unvorbelichteter Galle der Fall ist. Zu diesem Zwecke wurden Galle und Blutkörperchen vorbelichtet. Versetzte man nur vorbelichtete Blutkörperchen mit vorbelichteter Galle und die im Dunkeln gestandenen Blutkörperchen derselben Erythrocytenaufschwemmung mit unvorbelichteter Galle, so war kein Unterschied zwischen den entsprechenden Proben zu konstatieren. — Durch diese hier nur kurz besprochenen Versuche ist festgestellt, daß die Wärmestrahlen bei der photodynamischen Wirkung der Galle nicht wesentlich beteiligt sind und daß ferner diese nicht auf die Entstehung einer stärker hämolytisch wirkenden Substanz bei Belichtung der Galle zurückzuführen ist.

Daß man durch photodynamisch wirksame, fluorescierende Substanzen Toxine und Antitoxine im Lichte zu zerstören vermag, zeigten, wie schon bemerkt, die Versuche von H. v. Tappeiner und Jodlbauer. So wird z. B. Diphtherietoxin bei Zusatz von Eosin oder dichloranthracendisulfosaurem Natron nach 3tägiger Exposition im diffusen Tageslichte mäßiger Intensität derart geschädigt, daß Meerschweinchen nach Injektion der 120fach letalen Dosis gesund blieben. Ebenso wird Tetanustoxin durch 3tägige Exposition mit Eosin bedeutend abgeschwächt und auch Tetanusantitoxin leidet in Gegenwart von Eosin durch die Belichtung.

Zu ganz analogen Resultaten sind wir nun in Versuchen gekommen, bei denen wir Galle, gemischt mit Toxin oder Antitoxin, dem Sonnen- oder dem diffusen Tageslicht aussetzten. Es wurden immer unter denselben Verhältnissen, unter denen die Toxine mit Gallenzusatz belichtet waren, auch das Toxin allein und ebenso Galle allein belichtet. Alle Proben standen in Bechergläsern mit Wasser, das auf einer Temperatur von ca. 15° C gehalten wurde. Durch Injektion des allein vorbelichteten und auch des mit vorbelichteter Galle versetzten, vorbelichteten Toxines konnte gezeigt werden, daß zum Eintritte unserer Reaktion das gleichzeitige Aufeinanderwirken von Galle und Toxin nötig sei. Immer wurden Kontrollen im Dunkeln bei Zimmertemperatur (ca. 18° C) und bei 37° C angestellt.

In den letzteren kam es, wie zu erwarten, auch im Dunkeln zur Abschwächung des Toxins. Es dürften hierbei andere Stoffe (vielleicht gallensauere Salze) wirksam gewesen sein als die in der Sonne stärker wirkenden Gallenfarbstoffe. Von besonderem Interesse ist der Versuch mit Diphtherieantitoxin, in dem gezeigt werden konnte, daß eine 3stündige, unter starker Wasserkühlung vorgenommene Sonnenbelichtung bei Anwesenheit von Rindergalle das Antitoxin unwirksam machte, während dieselbe Mischung durch eine 3stündige Erwärmung auf 37° im Dunkeln nur eine unbedeutende Abschwächung erfuhr.

Das in den Versuchen 1 und 2 verwendete Diphtherietoxin (Mac Fárland) tötete in Mengen von 0,05 ccm Meerschweinchen im Gewichte von 200 bis 300 g nach längstens 48 Stunden (die Dosis letalis [Tod am 4. Tage] betrug 0,03 ccm). — Das im Versuche 3 verwendete Tetanustoxin (Ammonsulfatfällung aus Bouillonkulturen) tötete Mäuse von 20 g noch in Mengen von 0,000005 g, die zur Injektion verwendete Dosis entsprach also der 10fach letalen Dosis.

Das in Versuch 4 verwendete Diphtherieantitoxin enthielt 200 Antitoxineinheiten im Kubikzentimeter.

In den nachstehenden Tabellen bezeichnet das Wort „glatt“, daß an der Injektionsstelle kein Infiltrat, bekanntlich das untrügliche Symptom beginnender Diphtherietoxinwirkung, vorhanden war.

Aus den nachstehenden Tabellen ergibt sich, daß man durch Galle Toxine und Antitoxine im Licht bei einer Versuchsanordnung unwirksam machen kann, welche im Dunkeln weder Toxin noch Antitoxin schädigt. Es wurde demnach gezeigt, daß vom tierischen Organismus produzierte Substanzen imstande sind, im Lichte für ihn deletäre Stoffe zu vernichten. Ebenso können, wie aus unseren Versuchen mit Antitoxin hervorgeht, auch Schutzstoffe, die der Organismus selbst produziert hat, bei Belichtung unter Anwesenheit solcher Sensibilisatoren wirkungslos gemacht werden.

Damit ist der Beweis noch nicht erbracht, daß unter analogen Verhältnissen gerade durch Einwirkung von Galle auf Toxine

Versuch 1.

Toxin	Zusatz	Behandlung vor der Injektion	Injizierte Toxinmenge ccm	Gew. d. Meerschweinchens g	Beobachtungstage: 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
Diphtherietoxin Mac Fárland 1 ccm	Kaninchengalle 0,5 ccm	Mischung 3 Std. dem Sonnenlicht ausgesetzt (Kühlung!), 30. X. 08	0,05	300	Infiltr.	großes Infiltr.	großes Infiltr.	Infiltr. (überlebt)
„	physiol. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	„	0,05	300	großes weich. Infiltr.	weich. Infiltr.	todt	
„	Kaninchengalle 0,5 ccm	Im Dunkeln gehalten	0,05	300	„	„	todt	
„	Kaninchengalle 0,5 ccm	Mischung 3 Std. im Sonnenlicht, dann im diffusen Tageslicht 3 Tage lang, 30. X. bis 2. XI. (Kühlung!)	0,05	290	glatt	kleines Infiltr.	kleines Infiltr.	Resorpt. des Infiltr.
„	physiolog. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	„	0,05	290	weich. Infiltr.	großes weich. Infiltr.	todt	
„	Kaninchengalle 0,5 ccm	Im Dunkeln (3 Tage)	0,05	270	großes weich. Infiltr.	weich. Infiltr.	todt	
„	„	Im Dunkeln bei 37° (3 Std.), 30. X.	0,05	300	glatt	glatt	glatt	glatt
„	physiolog. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	„	0,05	300	weich. Infiltr.	weich. Infiltr.	todt	

Anmerkung: In allen Versuchen, in welchen die Galle (Kaninchengalle, Rindergalle) samt dem Toxin dem Lichte ausgesetzt war, trat eine intensive Braunfärbung der Mischung auf, während die Mischung im Dunkeln einen Stich ins Grüne behielt und fast farblos blieb.

oder Antitoxine bei Belichtung im menschlichen oder tierischen Körper solche Entgiftungen resp. Abschwächungen zustande

Versuch 2.

Toxin	Zusatz	Behandlung vor der Injektion	Injizierte Toxinmenge ccm	Gew. d. Meerschweinchens g	Beobachtungstage: 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
Diphtherietoxin Mac Fárland 1 ccm	Rindergalle A. 0,5 ccm	Mischung 3 Tage in diffusem Tageslicht (16. bis 19. I. 09, Kühlung!)	0,05	210	kleines Infiltr.	kleines Infiltr.	Infiltr.	Infiltr. (überlebt)
„	physiolog. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	„	0,05	215	weich. Infiltr.	todt		
„	Rindergalle A. 0,5 ccm	Toxin und Galle getrennt 3 Tage (16. bis 19. I.) in diffusem Tageslicht, vor der Injektion gemischt	0,05	215	„	großes weich. Infiltr. (schwer krank)	todt	
„	„	Mischung 3 Tage im Dunkeln	0,05	200	„	todt		
„	Rindergalle B. 0,5 ccm	Mischung 3 Tage in diffusem (16. bis 19. I.) Tageslicht	0,05	180	kleines hartes Infiltr.	Infiltr.	kleines Infiltr.	Res. d. Infiltr. überl.
„	„	Toxin und Galle getrennt 3 Tage (16. bis 19. I.) in diffusem Tageslicht, vor der Injektion gemischt	0,05	180	großes weich. Infiltr.	todt		
„	„	Mischung 3 Tage im Dunkeln	0,05	180	„	todt		

kommen. In dieser Mitteilung wollten wir nur an einem Paradigma zeigen, daß eine dem Tierkörper entstammende Substanz imstande ist, Toxin und Antitoxin im Lichte unwirksam zu machen. Die für das lebende Tier in Betracht kommenden

Versuch 3.

Toxin	Zusatz	Behandlung vor der Injektion	Injizierte Toxinmenge g	Beobachtung der injizierten Mäuse: 1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5., 6., 7. Tag
Tetanustoxin (0,1 g festen Toxins in 10 ccm NaCl-Lösg.) davon 0,5 ccm	Rindergalle 0,5 ccm	Mischung 3 Std. dem Sonnenlichte ausgesetzt 4. XI. 08 (unter Kühlung!)	0,00005	kein Tet.	kein Tet.	kein Tet.	kein Tet.	bleibt frei von Tet.
"	physiol. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	"	0,00005	leicht. Tet.	schwerster Tet. 5^h p.m. todt			
"	Rindergalle 0,5 ccm	Toxin und Galle getrennnt 3 Std. dem Sonnenlichte ausgesetzt vor der Injektion gemischt	0,00005	leicht. Tet. 5^h abd. schwer. Tetanus	todt			
"	"	Mischung 3 Std. im Dunkeln (bei Zimmertemper.)		leicht. Tet.	schwerer Tet.	todt (abd.)		

Verhältnisse sollen in unseren weiteren Versuchen ihre Klärung finden.

Nur auf einen Punkt sei noch hingewiesen. Mit ziemlicher Sicherheit kann man annehmen, daß alle jene Wirkungen, welche wir mit Sensibilisatoren des Tieres im Reagensglase zeigen, sich im Organismus selbst nur ungemein abgeschwächt abspielen können. Denn außer einer wahrscheinlich weniger reaktionsfähigen Form der Sensibilisatoren im Tierkörper tritt hier noch die Schutzwirkung des überall vorhandenen Serums gegen die photodynamische Wirkung hinzu. Busk[1]) hat zuerst auf diese abschwächende Wirkung des Serums hingewiesen. Auch wir konnten in Versuchen, von denen später ausführlich berichtet werden soll, feststellen, daß Serum imstande ist, die photodynamische Wirkung der Galle ganz erheblich abzuschwächen.

[1]) Diese Zeitschr. 1, 425, 1906.

Versuch 4.

Diphtherieantitoxin: Diphtherieheilserum Laudon, Aderlaß vom 27. X. 08; Wert: 200fach (glatt).

Antitoxin	Zusatz	Behandlung vor der Injektion	Injizierte Antitoxineinheiten	Meerschweinchengewicht g	Beobachtungstage:			
					1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag
Diphtherie-antitoxin 0,5 ccm	Rindergalle 0,5 ccm	Mischung 3 Std. im Sonnenlicht (Kühlung!) 4. XI. 08	200	250	großes weich. Infiltr.	todt		
"	physiol. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	"	200	250	glatt	glatt	glatt	glatt
"	Rindergalle 0,5 ccm	Mischung 3 Std. im Dunkeln (bei Zimmertemperatur)	200	250	"	"	"	"
"	Rindergalle 0,5 ccm	Mischung 3 Std. bei 37° im Dunkeln	200	250	kleines Infiltr.	kleines Infiltr.	Infiltr. resorbiert	"
"	physiol. NaCl-Lösg. 0,5 ccm	"	200	250	glatt	glatt	glatt	"

In unseren Versuchen bei Entgiftung von Toxin und Antitoxin durch Galle hatten wir es auch im Reagensglase besonders bei Einwirkung auf das Antitoxin offenbar mit stark abgeschwächter Wirkung zu tun.

Die Arbeit wird fortgesetzt, unter anderem auch mit Rücksicht auf die Gesichtspunkte, welche sich aus den oben mitgeteilten Befunden, betreffs der Aufbewahrung antitoxischer Sera ergeben haben.

Über die pharmakologischen Wirkungen der Placenta.

Von

S. Higuchi, Frauenarzt in Tokio.

(Aus dem Institut für Pharmakologie und physiologische Chemie der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 5. März 1909.)

Die biochemische Erforschung der Placenta ist seit einigen Jahren ein Lieblingsthema der geburtshilflichen Wissenschaft. Da dieses Organ für den Embryo beinahe als ein „Mädchen für alles“ dienen muß, hat man ein Recht, ihm gewisse chemische Funktionen zuzuschreiben, wie sie sonst der Lunge, der Niere, dem Darm und der Leber zukommen. So sind denn auch z. B. bereits verschiedene für den Abbau der Nährstoffe und bei anderen wichtigen Lebensprozessen eine Rolle spielende Fermente darin gefunden worden, nämlich autolytische bzw. proteolytische Enzyme, Tyrosinase, Lipase, Invertase, Diastase, glykolytisches Enzym, Oxydase, Aldehydase, Fibrinferment, Desamidase usw.[1]) Während nun von der Leber bekannt ist, daß sie sich in hervorragendem Grade auch an der Umwandlung von Arzneistoffen beteiligt, wußte man dies bisher von der Placenta noch kaum oder gar nicht.

[1]) Mathes, Über Autolyse der Placenta. Centralbl. f. Gyn. 1901, 1385. — Ascoli, Centralbl. f. Physiol. 1902, 124. — Hofbauer, Grundzüge einer Biologie der menschlichen Placenta, 1905, Wien und Leipzig. — Liepmann und Bergell, Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 46. — Acconci, I fermenti proteolitici della placenta usw. Archivio ital. di Ginec. Napoli, Anno 9, 2, 145 bis 149. Ref. Jahresber. f. Geb. u. Gyn. 20, 617, 1906. — Ferroni, Le ossidasi placentari. Annali di Ostetr. e Ginec. Milano, Anno 28, 1, 719 bis 788. Ref. Jahresber. f. Geb. u. Gyn. 20, 617, 1906. — Savoré, Zur Kenntnis der Fermente der Placenta. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9, Heft IV, 1907. — Basso, Über Autolyse der Placenta. Arch. f. Gyn. 76, 162, 1905.

Es schien daher Prof. Kobert berechtigt, zu prüfen, ob etwa auch letztere gewisse Arzneisubstanzen chemisch beeinflußt, also z. B. ob sie Glykoside spaltet, und ob sie Alkaloide zersetzt. Die nachstehenden Versuche sind von mir dieser Frage gewidmet. Ich spreche Herrn Prof. Sarwey für die gütige Überlassung der Placenten (52) meinen besten Dank auch im Namen von Prof. Kobert aus.

I. Spaltung von Glykosiden.

Was die Spaltung der Glykoside durch den ganzen tierischen Organismus sowie durch einzelne Organe desselben betrifft, so sind in dieser Hinsicht schon seit langem von verschiedenen Forschern zahlreiche Untersuchungen angestellt worden. Jedoch habe ich in der mir zugänglichen Literatur nirgendwo Angaben darüber gefunden, wie sich die Placenta, insbesondere die menschliche, in dieser Beziehung verhält. Ich glaube daher durch Mitteilung meiner Versuchsergebnisse eine Lücke ausfüllen zu können.

Was die Wertbestimmung der Antiseptica anlangt, so erwies sich vor den eigentlichen Experimenten eine Voruntersuchung als unumgänglich nötig. Um nämlich eine Störung der Ergebnisse durch eintretende Fäulnis der Placenta zu verhindern, war der Zusatz eines Antisepticums erforderlich, und zwar handelte es sich darum, ein solches zu wählen, welches einerseits die Fäulnis genügend hemmte, andrerseits aber auch die etwa vorhandenen nicht organisierten Fermente in ihrer Wirkung nicht beeinträchtige.

Unter Prof. Kobert haben H. Brüning[1]) und Karl Kobert[2]) über die Hemmung der Bakterienentwicklung in der Milch, namentlich durch ätherische Öle, gearbeitet. Ihre Methode fußt darauf, daß beim Fäulnisvorgange der einem Brei von animalischer Substanz zugesetzte Schwefel hydrolysiert

---

[1]) Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 3, 157, 1906; Centralbl. f. inn. Med. 1906, Nr. 14.

[2]) Systematische Versuche über die antisept. Wirkung von äther. Ölen und den Bestandteilen derselben. Handelsberichte von Schimmel u. Comp. 1906 und Pharm. Post 1907. Weitere Versuche sind gemacht, sind aber noch unveröffentlicht.

wird, wobei der Nachweis des gebildeten Schwefelwasserstoffes sich leicht mittels eines mit Bleiacetatlösung befeuchteten Papieres führen läßt.

Von dieser Methode machte ich nun auch Gebrauch. Ich vermischte innig feines, chemisch reines Schwefelpulver im Verhältnis 5:100 mit nach unten beschriebener Methode bereitetem Placentabrei und füllte von diesem Gemisch je etwa 10 g in vorher durch Kochen keimfrei gemachte Reagensgläser. Eine Probe des Gemisches ließ ich zur Kontrolle ohne Antisepticum, zu den anderen setzte ich mit Hilfe einer von mir eigens zu diesem Zwecke angefertigten feinen Pipette und unter nachfolgendem tüchtigem Durchschütteln

a) von Toluol 1, 2, 3, 4, 5, 6 Tropfen,

b) von Chloroform 2, 4, 6, 8, 10, 12 Tropfen,

c) von 40%iger Fluornatriumlösung 1, 2, 3, 4, 5, 6 Tropfen.

Von diesen Tropfen gingen bei Toluol 72, bei Chloroform 125, bei der Fluornatriumlösung 48 Tropfen auf 1 ccm. Alle 19 Gläschen wurden mit einem Streifen Bleiacetatpapier tragenden Wattepfropfen verschlossen und ins Wärmebad (Temperatur 37 bis 38° C) eingesetzt.

Befund.

a) Nach 12 Stunden:

Schwärzung des Bleiacetatpapieres bei der Kontrollprobe, bei den Proben mit 1 und 2 Tropfen Toluol, bei denen mit 2 und 4 Tropfen Chloroform und bei der ganzen Reihe der Proben mit Fluornatrium.

b) Nach 24 Stunden:

Schwärzung des Papieres auch bei den Proben mit 3 und 4 Tropfen Toluol und bei der mit 6 Tropfen Chloroform.

c) Nach 48 Stunden:

Schwache Schwärzung bei den Gläschen mit 5 Tropfen Toluol und mit 8 Tropfen Chloroform. Das Papier in den Proben mit 6 Tropfen Toluol und mit 10 und 12 Tropfen Chloroform ist weiß geblieben.

Es fällt mir nicht ein, behaupten zu wollen, daß 6 Tropfen Toluol bzw. 10 Tropfen Chloroform in dem Placenta-Schwefelgemisch alle Mikroben abgetötet

hätten, denn diesen Nachweis der Sterilität habe ich nicht geführt. Aber ich kann behaupten, daß durch die beiden Antiseptica die Vermehrung und die Wirksamkeit der Mikroben auf Null oder fast auf Null erniedrigt wurde. Es läßt sich also durch Zusatz von 0,7 °/₀ Toluol oder 0,64 °/₀ Chloroform innerhalb 24 Stunden und durch Zusatz von 0,83 °/₀ Toluol oder 0,8 °/₀ Chloroform innerhalb 48 Stunden eine Fäulnis in dem Placentabrei unbedingt hintanhalten. So habe ich in der Tat dabei auch niemals einen fauligen Geruch auftreten sehen. Das vielgepriesene Fluornatrium erwies sich für unsere Zwecke hier als völlig ungeeignet, da es einerseits in kleinen Mengen die Entwicklung organisierter Fermente und damit die Fäulnis nicht zu verhindern vermochte, und da es andrerseits, wie ich unten zeigen werde, doch schon in diesen geringen Quantitäten die Wirkung gewisser empfindlicher unorganisierter Fermente vernichtet oder wenigstens nicht aufkommen läßt. Auch das Urteil von Karl Kobert über die Wirkung dieses Antisepticums auf Milch ist kein sehr günstiges.

1. Spaltung von Amygdalin.

Durch Erwärmen mit verdünnten Mineralsäuren oder durch Digestion mit Emulsion wird das Amygdalin bekanntlich in Glucose, Benzaldehyd und Blausäure gespalten.

$$C_{20}H_{27}NO_{11} + 2H_2O = 2C_6H_{12}O_6 + C_7H_6O + CNH.$$

Morrigia und Ossi[1]) sind die ersten Forscher, die über die Zerlegung des Amygdalins durch den tierischen Organismus experimentiert haben. Ihre Versuche ergaben, daß das Amygdalin durch im Dünndarm und Coecum vorhandene, emulsinartig wirkende Stoffe verseift wird, und daß die Spaltungsprodukte Giftwirkung ausüben. Grisson[2]) stellte in unserem Institute unter Prof. Naße folgendes fest: Von den Organen des Tierkörpers ist allein der Intestinaltractus imstande, Amygdalin zu zersetzen, und zwar wird die Spaltung nicht durch die Verdauungssäfte des Magens oder Darmes, sondern lediglich durch die im Darme stets vorhandenen Fäulniserreger bewirkt.

[1]) Zitiert nach d. Jahresber. f. Tierchem. 6, 81, 1876.

[2]) Über das Verhalten der Glykoside im Tierkörper. Diss. Rostock 1887. Vgl. Salkowski in Virchow-Hirsch Pbt. 1, 152, 1887.

Die hierbei gebildete Blausäure bedingt die mehrfach beobachteten Vergiftungserscheinungen. Gérard[1]) bestätigte, daß der Dünndarm des Kaninchens Amygdalin spaltet, nicht aber das Pankreas. Als Spaltungsprodukt wurde auch von ihm Blausäure gefunden, während sich Zucker nicht nachweisen ließ. Durch Versuche in Rostock und Neapel hat Kobert[2]) nachgewiesen, daß viele wirbellose Tiere und deren Eier amygdalinspaltende Fermente enthalten. Gonnermann[3]), der hier in Rostock diese Versuche fortsetzte, bemerkte, daß die Leber des Rindes und des Hasen Amygdalin zu verseifen vermag, daß diejenige des Hundes und einiger anderer Tiere jedoch diese Fähigkeit nicht besitzt. Ferner stellte er fest, daß Pepsin und ein von ihm benutztes Pankreatin keine Einwirkung auf Amygdalin hatten, daß hingegen ein von ihm benutztes Trypsin im Verlaufe von 48 Stunden einen kräftigen Geruch nach Benzaldehyd hervorrief.

Aus dem Gesagten geht hervor, daß die Ansichten über die Spaltbarkeit des Amygdalins durch animalische Enzyme noch nicht ganz geklärt sind. Während Kobert für Zellenauszüge und Zellenbrei verschiedener Klassen von wirbellosen Tieren ein amygdalinspaltendes Enzym sichergestellt hat, gehen die Ansichten, was Wirbeltiere anlangt, noch recht weit auseinander. Während die bakterienfreien Sekrete des Magendarmkanals und speziell des Pankreas nach Grisson und nach Gérard nicht spaltend wirken, berichtet Gonnermann über ein amygdalinspaltendes Trypsinpräparat. Weiter fand Gonnermann den Leberzellenbrei einiger Tiere spaltend und den anderer Tiere nicht spaltend. Diese großen Widersprüche können nur durch weitere Versuche geklärt werden. Mir schien es daher aus theoretischen und praktischen Gründen interessant, das Verhalten der Placenta zu Amygdalin zu prüfen und z. T. mit dem Verhalten der Leber usw. zu vergleichen. Selbstverständlich benutzte ich ein möglichst reines, von C. Merck bezogenes Präparat des Amygdalins, das von Spaltungsprodukten und Verunreinigungen möglichst frei war.

---

[1]) Zitiert nach d. Jahresber. f. Tierchem. 26, 1896.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. 99, 116, 1903.

[3]) Ebenda 113, 1906 nach Apoth.-Zeitg.

Um die Zerlegbarkeit dieses Amygdalins durch die menschliche Placenta zu prüfen, verfuhr ich folgendermaßen: Von normalen Placenten wurden kurz nach der Geburt die Nabelschnur an ihrer Insertionsstelle und die Eihäute an der Peripherie des Mutterkuchens abgeschnitten, das in den großen Gefäßen enthaltene Blut durch Ausstreifen entfernt und das der Außenfläche anhaftende Blut mit einem reinen Tuche oder mit Filterpapier weggetupft. Von einer vollständigen Entfernung des Blutes durch Injektion von physiologischer Kochsalzlösung oder durch Auswaschen mit derselben nahm ich deshalb Abstand, weil durch diese Behandlung, wie ich nachgewiesen habe,[1]) gleichzeitig auch andere lösliche Stoffe aus der Placenta fortgeschwemmt werden. Darauf wurde die Placenta mit Hilfe einer Hackmaschine zerkleinert. Von dem gut durchgemischten Brei wurden immer je 50 g abgewogen und in einer Reibschale mittels Glaspulvers zu feinem Mus zerrieben. Dazu wurden dann 0,5 g krystallinisches Amygdalin sowie ein Antisepticum (vgl. unten) und immer gleich viel 0,9$^{0}/_{0}$ige Kochsalzlösung hinzugefügt und das Ganze recht innig vermengt. Zum Nachspülen der Reibschale benutzte ich so viel Kochsalzlösung, daß deren Gesamtmenge stets 50 ccm betrug. Alle Versuche wiederholte ich zwei- bis dreimal.

Als Antisepticum habe ich zu den verschiedenen Einzelportionen folgende Arten und Mengen verwendet.

1. Toluol (ccm) und Fluornatrium (g):
   a) 0,25 T. + 0,25 F.; b) 0,5 T. + 0,25 F.;
   c) 0,5 T. + 0,5 F.; d) 0,5 T. + 1,0 F.;
   e) 0,75 T. + 0,75 F.; f) 1,0 T. + 1,0 F.
2. Fluornatrium allein (g):
   a) 0,1, b) 0,2, c) 0,25;
3. Toluol (ccm):
   a) 0,25, b) 0,5, c) 0,75, d) 1,0, e) 1,5;
4. Chloroform (ccm):
   a) 0,25, b) 0,5, c) 0,75, d) 1,0, e) 1,5;
5. Toluol (ccm) + Chloroform (ccm):
   a) je 0,25, b) je 0,5;

[1]) Diese Zeitschr. 15, 95, 1908.

6. 36%iges Formaldehyd (ccm):

a) 0,3, b) 1,0.

Kontrollversuche wurden in der Weise angestellt, daß einmal 100 ccm 0,9%ige Kochsalzlösung ohne Placentabrei mit 1,0 ccm Toluol und 0,5 g Amygdalin — ein anderes Mal 50 g Placentabrei mit 50 ccm Kochsalzlösung und 0,5 g Amygdalin ohne Antisepticum, ein drittes Mal 50 g 15 Min. auf dem Wasserbade gekochter Placentabrei mit 1 ccm Toluol, 0,5 g Amygdalin und 50 ccm Kochsalzlösung versetzt wurden.

Zur weiteren Kontrolle habe ich außer dem menschlichen Placentabrei noch Blut, Leber, Nieren, Gehirn und Muskeln vom Kaninchen in gleicher Weise unter Zusatz von Amygdalin und 0,9%iger Kochsalzlösung und mit oder ohne Zusatz eines Antisepticums zu Mus zerrieben. Hierbei waren die Mengenverhältnisse wie folgt:

A. Blut 30 ccm:
Amygdalin 0,2 g,
Toluol 0,6 ccm oder NaFl 0,15 g oder kein Antisepticum,
0,9%ige NaCl-Lösung 30 ccm.

B. Leber 30 g:
Amygdalin 0,3 g,
Toluol 0,6 ccm oder NaFl 0,15 g oder kein Antisepticum,
0,9%ige NaCl-Lösung 30 ccm.

C. Muskeln 30 g:
Amygdalin 0,3 g,
Toluol 0,6 ccm oder NaFl 0,15 g oder kein Antisepticum,
0,9%ige NaCl-Lösung 30 ccm.

D. Nieren 10, 11, 15, 8, 10 g:
Amygdalin 0,2 g,
Toluol 0,4 ccm oder NaFl 0,1 g oder kein Antisepticum,
0,9%ige NaCl-Lösung 30 ccm.

E. Gehirn 8, 8, 9, 10, 7 g:
Amygdalin 0,2 g,
Toluol 0,4 ccm oder NaFl 0,1 g oder kein Antisepticum,
0,9%ige NaCl-Lösung 30 ccm.

Die nach der oben beschriebenen Methode hergestellten Placentagemenge und ebenso die Kontrollproben wurden einzeln in bedeckten Gefäßen ins Wärmebad (Temperatur 37 bis 38° C) eingesetzt.

Gewöhnlich nach 24, in wenigen Fällen auch erst nach 36 Stunden wurde aus jedem Gefäße der Inhalt in einen Kolben umgegossen, das Gefäß gründlich mit Wasser nachgespült, das Spülwasser ebenfalls in den Kolben gebracht und das Ganze nach Ansäuerung mit ein paar Tropfen Weinsäure der fraktionierten Destillation unterworfen.

Um in dem so gewonnenen Destillat Blausäure nachzuweisen, prüfte ich auf folgende Reaktionen:

1. Bläuung frisch bereiteter Guajactinktur-Kupfersulfatlösung.
2. Berlinerblau-Reaktion.
3. Schwärzung ammoniakalischer Silbernitratlösung.
4. Cyanhämoglobinbildung nach Kobert[1]).

Ich gelangte zu folgenden Ergebnissen:

I. Placenta.

1. In der keinen Placentabrei enthaltenden Kontrollprobe ist nach 24 Stunden keine Blausäure abgespalten.

2. In dem Versuche mit gekochtem Placentabrei konnte nach 24 Stunden keine Blausäure nachgewiesen werden.

3. In der Kontrollprobe, bei der zu dem Placentagemenge kein Antisepticum hinzugefügt war, ist nach 24 Stunden CNH nachweisbar; es finden sich gleichzeitig starke Fäulniserscheinungen.

4. In dem mit Toluol + Fluornatrium versetzten Placentagemenge ist nach 24 bis 36 Stunden keine Blausäure abgespalten.

5. Nur in einer mit 0,1 g Fluornatrium versetzten Probe hat nach 24 Stunden eine Entwicklung von CNH stattgefunden. Und auch hier war bei der Wiederholung dieses Versuches mit der gleichen Menge NaFl der Ausfall negativ; desgleichen bei den Proben mit 0,2 und 0,25 g NaFl.

Ausgehend von der Tatsache, daß die antifermentative, d. h. gerinnungverhindernde Wirkung des Natriumsalzes der Oxalsäure und der Fluorwasserstoffsäure im Blute auf einer Kalkentziehung aus dem Blute beruht, lag der Gedanke nahe, bezüglich der antifermentativen Wirkung des Fluornatriums in unserem Versuche einen analogen Vorgang anzunehmen. Diese

---

[1]) R. Kobert, Über Cyanmethämoglobin und den Nachweis der Blausäure. Stuttgart 1891.

Annahme erwies sich indessen als unzutreffend, da Natriumoxalat die Spaltung des Amygdalins nicht hinderte. Denn bei einem Versuche, in dem ich statt Fluornatrium 0,2 g Natriumoxalat benutzte, stellte sich nach 18 Stunden ein kräftiger Geruch nach bitteren Mandeln ein, und das nach 24 Stunden erzielte Destillat gab intensive Blausäurereaktionen.

6. In den Proben mit 0,25 bis 1,0 ccm Toluol konnte ich jedesmal nach 24 Stunden Blausäure nachweisen; in denjenigen mit 1,5 g war die Blausäureentwicklung nach 24 Stunden noch recht schwach, dagegen nach 36 Stunden ziemlich beträchtlich.

Die Mengen von 0,25 und 0,5 ccm Toluol reichten nicht aus, um innerhalb von 24 Stunden Fäulnis zu verhindern.

7. Die Chloroformproben ergaben bei Quantitäten von 0,25 bis 0,75 ccm nach 24 Stunden deutliche Blausäurereaktionen. Bei 1,0 waren die Reaktionen nach 24 Stunden ganz schwach, nach 36 Stunden aber ausgesprochen. Bei 1,5 ccm war nach 36 Stunden das Amygdalin nicht zerlegt.

8. In den Versuchen mit Toluol + Chloroform gelang der Nachweis von CNH nach 24 Stunden jedesmal.

9. Formalin verhinderte absolut die Amygdalinspaltung.

II. Kaninchenorgane.

In sämtlichen Proben ohne Antisepticum hat sich bei allen fünf Organen nach 24 Stunden eine Spaltung des Amygdalins eingestellt; aber diese konnte ja ausschließlich auf der eingetretenen Fäulnis beruhen und hat daher für uns hier keinen Wert. In den mit Antisepticum versetzten Portionen der genannten Organe trat natürlich keine Fäulnis ein, wohl aber war unbeschadet des Toluolzusatzes bei Leber und Nieren eine enzymatische CNH-Abspaltung zu konstatieren; bei Gehirn, Blut und Muskeln hingegen nicht.

Von den Fluornatriumproben ergab bei der Prüfung auf abgespaltene CNH ein positives Resultat nur die Leber.

Das Ergebnis aller dieser Versuche läßt sich in folgende Sätze zusammenfassen:

Placentabrei ohne Antisepticum bleibt, auch wenn er ganz frisch verwendet wird, bei der Manipulation des Zerreibens nicht steril, und entsprechend der Entwicklung von Fäulnisbakterien kann schon dadurch allein eine Spaltung des Amyg-

dalins vor sich gehen. Fluornatrium oder Formalin als Antisepticum zugesetzt, hemmten nicht nur die bakterielle Glykosidspaltung, sondern auch die enzymatische, welche die in den Placentazellen enthaltenen glykosidspaltenden Enzyme etwa ausführen könnten. Ein Gemisch von Chloroform und Toluol dagegen schloß zwar auch die Fäulnis aus, gestattete aber den Enzymen der Placentazellen, eine glykosidspaltende Funktion auszuüben. Blut, Leber, Muskeln, Nieren und Gehirn wurden durch obige Antiseptica ebenfalls vor Fäulnis bewahrt. Glykosidspaltende Enzyme ließen sich, wie zu erwarten war, nur in Leber und Niere nachweisen; in ersterer wurden sie selbst durch Fluornatrium in ihrer Tätigkeit nicht völlig lahmgelegt.

Die menschliche Placenta reiht sich also nach den Versuchen mit Amygdalin denjenigen Organen ein, welche enzymatische Glykosidspaltungen auszuführen vermögen, und zwar ist ihre glykosidspaltende Kraft der der Niere des Kaninchens vergleichbar, steht der der Leber des Kaninchens aber nach.

An diese Versuche schloß ich noch drei andere an:

1. 300 g Placentabrei + 6 ccm Toluol + 300 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung wurden zu Brei zerrieben, das Ganze, in ein Linnentuch eingeschlagen, unter der Preßmaschine ausgepreßt und der Preßsaft durch Papier filtriert. In je 100 ccm des Filtrates löste ich 0,5 g Amygdalin und brachte diese Portionen ins Wärmebad. Nach 24 Stunden war eine Spaltung des Amygdalins eingetreten.

Bei dem analogen Versuche mit Fluornatrium war keine Blausäure nachweisbar.

Diese Versuche zeigen, daß die Hauptmenge des Zellenbreies für die Spaltung unseres Glykosides nicht unbedingt nötig ist, da auch das Filtrat, welches zwar trübe war, aber doch nur relativ wenige Zellen bzw. Zellentrümmer enthalten konnte, noch wirksam war. Allerdings war die Intensität der Wirkung bei dem Zellenbrei stärker als bei dem Filtrate. Dies stimmt zu den Erfahrungen vieler früherer Versuche über Enzyme.

2. 300 g Placentabrei wurde 48 Stunden hindurch mit 600 ccm 94%igen Alkohols, danach weitere 24 Stunden mit

300 ccm Äther extrahiert; der ausgezogene Brei wurde sodann im Vakuum völlig getrocknet und pulverisiert. Das Gewicht des Pulvers betrug 49,6 g, so daß also 1 g Pulver etwa 6 g Placentabrei entsprach. Je 2 g Pulver wurden nun zusammen mit 0,2 g Amygdalin + 0,2 ccm Toluol + 20 ccm Aq. dest. für 24 Stunden ins Wärmebad gebracht. Nach dieser Zeit ließ sich eine Entwicklung von Blausäure nicht feststellen. Die mit Alkoholäther erschöpften Zellen hatten nach dem Trocknen keine spaltende Wirkung mehr. Die Einwirkung von Alkohol, Äther und das scharfe Trocknen hatten das glykosidspaltende Enzym wirkungsunfähig gemacht.

3. Der bei Operation 2 erhaltene alkoholisch ätherische Auszug wird auf dem Wasserbade eingedampft und der tiefbraune Rückstand mit 60 ccm Aq. dest. aufgenommen. 10 ccm dieser Flüssigkeit versetzte ich mit 0,2 g Amygdalin und 0,1 ccm Toluol, ließ das Gemisch 24 Stunden in der Wärme stehen, filtrierte und prüfte das Filtrat auf Blausäure. Diese war nicht nachweisbar.

Das mit Alkoholäther gewonnene und dann eingedunstete Extrakt der Placentazellen sowie die nach dieser Extraktion sich ergebenden und dann getrockneten Placentazellen besaßen beide keine glykosidspaltenden Eigenschaften mehr. Dies war von vornherein erwartet worden, mußte aber doch durch einige Versuche dargetan werden.

Im ganzen wurden 82 Versuche über Amygdalinspaltung angestellt. Die angeführten geben das wesentliche Resultat wieder.

2. Spaltung von Arbutin.

Arbutin ist ein in den Folia Uvae ursi enthaltenes Glykosid, welches 1852 von Kawalier[1]) entdeckt wurde. Es kommt auch noch in verschiedenen anderen Ericaceen vor. Fast immer ist es von einem zweiten Glykosid, dem Methylarbutin begleitet. Arbutin krystallisiert in langen, feinen, seidenglänzenden, weißen Nadeln und ist in Äther und kaltem Wasser schwer, in Alkohol und heißem Wasser leicht löslich. Arbutinlösung reduziert weder Fehlingsche Lösung noch ammonia-

[1]) Ann. d. Chem. u. Pharm. 83, 356, 1852.

kalische Silbernitratlösung. Die empirische Formel des Arbutins ist $C_{12}H_{16}O_7$. Durch Digestion mit Emulsin oder durch Kochen mit Mineralsäuren wird es in Glykose und Hydrochinen gespalten:

$$C_{12}H_{16}O_7 + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_4(OH)_2.$$

Die Tatsache, daß Arbutin im Tierkörper zerlegt wird, ist schon lange bekannt. v. Mering[1]) und L. Lewin[2]) fanden unabhängig voneinander, daß von dem dem Organismus einverleibten Arbutin ein Teil unzersetzt zur Ausscheidung gelangt, während der übrige Teil verseift wird. Feibes[3]) gibt dies indes nicht zu und behauptet, daß gar keine Zerlegung des Arbutins im Körper stattfindet. Die nach Arbutingenuß eintretende Dunkelfärbung des Harnes beim Stehen an der Luft führt er auf eine spontane Zersetzung des mit dem Harne ausgeschiedenen unveränderten Arbutins zurück, während von anderen Forschern festgestellt ist, daß sie auf einer Umwandlung der im Organismus entstandenen Hydrochinonschwefelsäure beruht. Nichtsdestoweniger gibt Feibes selbst zu, daß Speichel in geringem Maße und Magensaft in beträchtlicherem Grade eine zerlegende Wirkung auf das Arbutin ausüben.

Grisson[4]) erzielte mit Glycerinextrakt aus Kaninchen- und Hundemagen keine Arbutinspaltung und kam daher zu der Ansicht, daß das Arbutin vom Magen unzerlegt resorbiert wird. Im Darme dagegen tritt Spaltung ein, und zwar genügt hierzu die hier vorhandene Fäulnis. Dies wird dadurch bewiesen, daß aus dem Filtrate einer mit Arbutin versetzten faulenden Flüssigkeit große Mengen von Hydrochinon sich durch Äther extrahieren lassen. Ferner stellte Grisson durch seine Versuche fest, daß durch Nieren und Leber von Kaninchen, Katze und Hund, durch Hunde- und Katzenlungen und durch Katzenmilz eine Abspaltung von Hydrochinon aus Arbutin bewirkt wird. Nach seiner Angabe findet sich diese Wirkung jedoch nicht bei Blut und Lungen vom Kaninchen sowie bei Muskeln von Kaninchen, Katze und Hund.

---

[1]) Pflügers Archiv 14, 276, 1877.

[2]) Virchows Archiv 92, 517, 1883.

[3]) Über das Schicksal d. Arbutins im menschl. Organismus. Inaug.-Diss., Würzburg 1884.

[4]) l. c.

Gonnermann[1]) bestätigte und ergänzte, daß durch Leber vom Rind, Hasen, Hund und Pferd eine starke, durch Fischleber hingegen nur eine ganz schwache Arbutinspaltung hervorgerufen wird. Er tat auch dar, daß käufliche tierische Enzyme, wie Pepsin, Pankreatin, Trypsin, nicht die Fähigkeit besitzen, Arbutin zu verseifen.

Kobert[2]) entdeckte arbutinspaltende Enzyme in dem Extrakt aus vielen Avertebraten, wie Kreuzspinnen, Trochosen, Maikäfer, Ameisenpuppen, Askariden usw.

Ich habe nun mit Arbutin (von Merck) drei Reihen von Versuchen gemacht, um die Wirksamkeit der menschlichen Placenta zu prüfen.

1. 50 g Placentabrei werden unter Vermischung mit 0,5 g Arbutin, 1,0 ccm Toluol und 50 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung zerrieben, in einem bedeckten Gefäße auf 24 Stunden ins Wärmebad gebracht, darauf mit dem doppelten Volumen 94%igen Alkohols gemischt, 6 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann durch Papier filtriert. Das leicht gelblich gefärbte, klare Filtrat wird auf dem Wasserbade bis zum Trocknen eingedampft; der verbleibende braune Rückstand wird mit Äther ausgezogen und dieser Auszug durch Eindampfen vom Äther befreit. Der jetzt sich ergebende farblose Rückstand wird mit 10 ccm Aq. dest. aufgenommen, filtriert und das Filtrat zur Prüfung verwendet.

2. Es wird genau wie bei 1. verfahren, nur wird das Zerriebene nicht ins Wärmebad eingesetzt, sondern statt dessen 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann sogleich der Einwirkung des Alkohols und der weiteren Behandlung unterworfen.

3. Ebenfalls analoges Verfahren wie bei 1., jedoch mit dem Unterschiede, daß statt des Placentabreies 50 ccm physiologische NaCl-Lösung, also im ganzen 100 ccm, benutzt werden.

Im ersten Versuche wirkte die Lösung des Verdunstungsrückstandes des Ätherauszuges auf Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silbernitratlösung stark reduzierend (Hydrochinon). Die wässerige Lösung des bei der Extraktion nicht in

---

[1]) l. c.

[2]) l. c.

den Äther übergegangenen Teiles des braunen Rückstandes reduzierte Fehlingsche Lösung energisch (Zucker).

Das nach obiger Methode 1, jedoch ohne Arbutinzusatz gewonnene Filtrat wird zur Kontrolle auf dem Wasserbade getrocknet, der Rückstand mit 10 ccm Aq. dest. aufgeschwemmt und filtriert. Dieses Filtrat reduziert Fehlingsche Lösung nur ganz minimal. Um mittels Fehlingscher Lösung Zucker in dem Filtrat der Proben mit Placentasubstanz nachzuweisen, wurde stets das Filtrat der ohne Arbutin angesetzten Placenta zur Vergleichung herangezogen.

Meine Versuche beweisen, daß das Arbutin durch in der Placenta enthaltene Enzyme zerlegt worden ist.

Der zweite und dritte Versuch ergaben nicht die Bildung von Hydrochinon und Zucker, denn weder der ätherlösliche noch der in Äther unlösliche Teil des Rückstandes entfaltete reduzierende Wirkung. Dieser Ausfall entsprach meinen Erwartungen.

Aus wiederholt angestellten Versuchen, in denen ich in der oben unter 1. beschriebenen Weise verfuhr, an Stelle des Toluols aber 0,25 g Fluornatrium zufügte, ging hervor, daß letzteres die Spaltung des Arbutins verhindert.

Außerdem ergab sich in einem Versuche mit 2 g Placentapulver, 0,2 g Arbutin, 0,2 ccm Toluol, 20 ccm Aq. dest. weder für Hydrochinon noch für Zucker ein positiver Ausfall der Reaktionen.

In 10 ccm wässeriger Aufschwemmung von alkoholätherischem Extrakt, 0,2 g Arbutin und 0,1 ccm Toluol konnte ich nach 24 Stunden ebenfalls keine Arbutinspaltung nachweisen.

Alle diese Ergebnisse stimmen zu den bei der Amygdalinspaltung erhaltenen. Das trockene Placentapulver sowie der vor dem Trocknen gewonnene alkoholisch-ätherische Auszug sind nicht imstande, arbutinspaltend zu wirken.

Kontrollversuche mit Kaninchenorganen wurden in folgenden Mengenverhältnissen angestellt:

1. Leber 27,0 g
   Arbutin 0,3 g
   Toluol 0,6 ccm
   0,9 %ige NaCl-Lösung 30,0 ccm

2. Nieren 10,0 g
   Arbutin 0,2 g
   Toluol 0,4 ccm
   0,9%ige NaCl-Lösung 30,0 ccm
3. Gehirn 8,0 g
   Arbutin 0,2 g
   Toluol 0,4 ccm
   0,9%ige NaCl-Lösung 30,0 ccm
4. Muskeln 30,0 g
   Arbutin 0,2 g
   Toluol 0,6 ccm
   0,9%ige NaCl-Lösung 30,0 ccm

Das Resultat war hier für Leber und Nieren positiv, für Gehirn und Muskeln negativ.

Das Ergebnis dieser Versuche lautet, daß auch hier bei Anwesenheit von Fluornatrium durch Brei von Leber, Nieren, Gehirn und Muskeln keine Fermentwirkung auf Arbutin stattfindet; bei Anwesenheit von Toluol jedoch wirkt analog dem Enzym der Placenta auch eins der Leber und der Nieren spaltend auf Arbutin ein.

8. Spaltung von Salicin.

Salicin ist zuerst von Leroux 1837 in der Rinde mehrerer Weidenarten entdeckt, nachher aber von anderen auch in verschiedenen Pappelarten aufgefunden worden und soll auch im Castoreum enthalten sein. Es bildet weiße, glänzende, rhombische Krystalle, ist in kaltem Wasser und Alkohol schwer löslich, leicht in heißem Wasser, gar nicht in Äther. Seine empirische Formel ist $C_{13}H_{18}O_7$. Wenn es mit verdünnten Säuren schwach erwärmt wird, so spaltet es sich unter Aufnahme von einem Molekül Wasser in Glucose und Saligenin:

$$C_{13}H_{18}O_7 + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_7H_8O_2.$$

Zum Nachweise eingetretener Zersetzung des Salicins dient die Eisenchloridreaktion, die mit Saligenin, gerade so wie mit Phenol und Salicylsäure, Violettfärbung gibt. Salicin selbst wird durch Eisenchlorid weder gefärbt noch zerlegt. Beim Erwärmen mit Millons Reagens färbt sich Saligenin tiefrot, während Salicin unverändert bleibt.

Daß dem Speichel eine salicinzersetzende Wirkung innewohne, wurde zunächst von Staedeler[1]) und später mit ihm übereinstimmend von Beilstein und Jacobson[2]) behauptet. Scheffer[3]) dagegen sprach sich dahin aus, daß wohl der von Staedeler verwendete Speichel „besonders fermentreich" (soll wohl heißen: durch Mundbakterien verunreinigt) gewesen sei, und kommt zu dem Schluß, daß dem reinen Speichel keine allgemeine Bedeutung als Zersetzungsmittel des Salicins zugemessen werden könne. Buchwald[4]) ist derselben Ansicht wie Scheffer. Auch Cohnheim[5]), Nasse[6]) und Grisson[7]) konstatierten, daß Speichel gar nicht auf Salicin einwirkt.

Was nun die Zerlegbarkeit des Salicins durch den Darm anlangt, so kam Marmé[8]) auf Grund seiner Experimente zu dem Schlusse, daß eine Spaltung im oberen Abschnitte des Dünndarmes durch die Drüsensekrete erfolge. Grisson[7]) der übrigens auch die Unwirksamkeit des Magensekretes nachwies, hält es zwar für gewiß, daß Salicin im Darme zerlegt werden kann, möchte aber die Wirkung eher der Fäulnis als den Sekreten zuschreiben. Er war es auch, der zuerst den Nachweis erbrachte, daß in Nieren und Leber vom Kaninchen salicinspaltende Fermente enthalten sind, dagegen nicht im Blute von Kaninchen, Hund und Katze, ebensowenig in Lungen, Leber, Nieren des Hundes und in den Muskeln von Kaninchen, Katze und Hund.

Kobert[9]) hat die Salicinspaltung durch Zellenbrei oder Extrakte vieler Avertebraten, z. B. von Epeiren, Trochosa singoriensis, Maikäfern, Ameisenpuppen, Asseln, weiblichen Geschlechtsprodukten von Arbacien usw. festgestellt.

Ich habe nun, um die Wirksamkeit der menschlichen Placenta zu studieren, genau wie beim Arbutin wieder drei

---

[1]) Jahresber. d. Chem. 1857, 559.

[2]) Die Glykoside, Breslau 1887, S. 130.

[3]) Das Salicin. Inaug.-Diss., Marburg 1860.

[4]) Jahresber. d. Chem. 1875.

[5]) Virchows Archiv 28, 241, 1863.

[6]) Pflügers Archiv 11, 156, 1875.

[7]) l. c.

[8]) Nachrichten v. d. K. Gesellsch. d. Wissensch. u. d. Universität z. Göttingen 1878.

[9]) l. c.

verschiedene Versuchsreihen angestellt, und zwar mit je 50 g Placentabrei (bzw. 50 ccm Kochsalzlösung), 0,5 g Salicin (von Merck), 1,0 ccm Toluol, 50 ccm physiologische NaCl-Lösung. Im Wärmebade standen die Präparate bei 1. und 3. auch wieder 24 Stunden, desgleichen bei 1., 2. und 3. nachher 6 Stunden bei Zimmertemperatur unter der Alkoholeinwirkung. Der ätherlösliche Teil des Filterrückstandes wurde mit Eisenchloridlösung und Millons Reagens auf Saligenin geprüft, der ätherunlösliche mit Fehlingscher Lösung auf Zucker.

Es ergab sich bei 1. ein positiver Ausfall beider Reaktionen, bei 2. und 3. ein negativer.

Damit ist also bewiesen, daß die menschliche Placenta ein Salicin spaltendes Ferment enthält, welches bei Toluolanwesenheit nicht unwirksam wird. Die Placenta übertrifft also in dieser Beziehung die Hundeleber und Hundeniere.

Bei den Experimenten mit dem oben besprochenen Placentapulver und mit Alkoholätherextrakt trat keine Zerlegung des Salicins ein. Dies stimmt zu den Versuchen mit Amygdalin und Arbutin.

4. Spaltung von Helicin.

Helicin ist ein Glykosid von der empirischen Formel $C_{13}H_{16}O_7$. Es wurde von Michael zuerst dargestellt, und zwar auf künstlichem Wege. Ein Vorkommen von Helicin in der Natur ist noch nicht beobachtet worden. Zur künstlichen Darstellung gibt es verschiedene Methoden. Helicin entsteht, neben Helicoidin, bei vorsichtiger Oxydation des Salicins mit verdünnter Salpetersäure; umgekehrt kann man durch Reduktion des Helicins wieder Salicin erhalten. Synthetisch läßt sich Helicin darstellen durch Vermischen der alkoholischen Lösungen von Acetochlorhydrose und Salicylaldehydkalium. Helicin bildet feine, weiße, in Büscheln oder Strahlen angeordnete Nadeln. Es ist schwer löslich in kaltem, leicht in heißem Wasser und in Alkohol, unlöslich in Äther. Durch Erwärmen mit verdünnten Mineralsäuren oder wässerigen Alkalien sowie durch Digestion mit Emulsin wird, unter Aufnahme eines Moleküls Wasser, eine Zerlegung des Helicins in Dextrose und Salicylaldehyd herbeigeführt.

$$C_{13}H_{16}O_7 + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_6H_4OHCOH.$$

Eine eingetretene Zersetzung kann man also aus dem positiven Ausfall der Reaktionen auf diese beiden Spaltungsprodukte erkennen, von denen mein Helicinpräparat frei war. Als Unterscheidungsmerkmal zwischen Helicin und Salicylaldehyd kann man einfach die Eisenchloridreaktion benutzen. Denn während das erstere dabei keine Veränderung erleidet, zeigt das letztere tiefe Violettfärbung.

Grisson[1]) ermittelte die Spaltbarkeit des Helicins durch Nieren und Leber von Kaninchen und Katze und durch Hundenieren. Die spaltende Wirkung blieb aus bei Speichel vom Menschen, bei Magenextrakt von Kaninchen und Hund, ferner bei Muskulatur von Kaninchen, Katze und Hund und bei Blut und Lunge von Katze und Hund.

Nach Kobert[2]) wird das Helicin von Enzymen der verschiedensten Avertebraten relativ leicht zerlegt. Als unwirksam erwiesen sich nur die Auszüge aus Fliegen und Hundetänien.

Ich habe mit je 0,5 g Helicin (von Merck) genau wie bei den beiden vorhergehenden Glykosiden gearbeitet und mit Eisenchloridlösung auf Salicylaldehyd, mit Fehlingscher Lösung auf Zucker geprüft. In dem Hauptversuche, bei dem das Placentagemisch 24 Stunden im Wärmebade gestanden hatte, war der Ausfall der Reaktionen positiv, bei den beiden anderen vergleichsweise angestellten Versuchen negativ. Es ergibt sich mithin, daß menschliche Placenta eine Spaltung des Helicins hervorzurufen vermag. Bei den Versuchen mit Placentapulver und mit Alkoholätherextrakt konnte nach 24 Stunden keine Spaltung von Helicin nachgewiesen werden.

Also auch in bezug auf Helicinspaltung reihen sich die lebenden Zellen der Placenta der Leber und Niere an, d. h. sie produzieren ein Enzym, welches dieses Glykosid hydrolytisch zerlegt.

Da nach neueren Anschauungen alle Enzyme, welche hydrolytische Glykosidspaltungen auszuführen vermögen, bei gewisser Konzentration und Anordnung des Versuches auch synthetisch tätig sein können, wird es die Aufgabe weiterer Versuche sein müssen, mit Hilfe von Enzymen der Leber, Niere und Placenta

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.

künstlich Glykoside aus ihren Paarlingen aufzubauen, wie dies z. B. von Rosenthaler[1]) für pflanzliche Glykosidspaltungsenzyme in Angriff genommen worden ist.

5. Spaltung von Sapotoxin.

Mit dem Namen Sapotoxin ist von Kobert[2]) eine Gruppe von Saponinsubstanzen belegt worden, welche alle annähernd die empirische Formel $C_{17}H_{26}O_{10}$ haben, jedoch aus Rinde, Wurzeln und Samen verschiedener Pflanzen stammen. Das von mir benutzte Sapotoxin war nicht das gewöhnliche der Quillajarinde entstammende, sondern teils das aus Radix Saponariae albae sive levanticae gewonnene, teils das auch als Assamin bezeichnete Assamtee-Sapotoxin. Ersteres ist ein schneeweißes Pulver, in Wasser löslich und frei von fremden Beimischungen, namentlich auch von Zucker; letzteres war auch ganz rein, aber nicht so schön weiß wie jenes.

Sapotoxin wird beim Erhitzen seiner Lösungen mit verdünnten Mineralsäuren in mehrere Zuckerarten, unter denen sich jedoch Traubenzucker nicht befindet, sowie in ein Sapogenin gespalten. Letzteres ist, was mein erstes Sapotoxin anlangt, unlöslicher und ungiftiger als die Muttersubstanz und läßt sich durch die bei gehöriger Verdünnung fehlende hämolytische Wirkung leicht vom Sapotoxin unterscheiden. Das bei der Spaltung entstehende Zuckergemisch läßt sich bei unvollkommener Spaltung durch Fehlingsche Lösung nicht bequem nachweisen; denn durch den unzersetzten Teil des Sapotoxins selbst wird in der Lösung beim Erwärmen eine tiefgrüne, sehr intensive Trübung hervorgerufen, aus der erst bei mindestens 24stündigem Stehen an der Luft ein orangefarbener Niederschlag ausfällt.

Bei Versuchen mit Avertebraten beobachteten Kobert[3]) und sein Schüler Fischer eine indes nur sehr schwache Sapotoxinspaltung durch Kreuzspinne, Tarantel, Ameisenpuppen. Bei vielen anderen wirbellosen Tieren blieb diese Wirkung gänzlich aus.

---

[1]) Arch. d. Pharm. 246, 365, 1908.

[2]) Beitr. z. Kenntnis der Saponinsubstanzen. Stuttgart 1904.

[3]) l. c.

Gonnermann[1]) berichtet, daß er durch Leber vom Rind und Hasen eine energische, durch die vom Hund, Pferd und Fisch eine nur schwache Abspaltung einer Glykose aus dem Sapotoxin erzielte.

Ich stellte meine Versuche wieder in der oben beschriebenen Weise an, jedoch unterließ ich die Ätherextraktion des durch Eindampfen gewonnenen braunen (bzw. bei dem Kontrollversuche nur mit physiologischer Kochsalzlösung weißen) Rückstandes, sondern löste diesen direkt in 10 ccm Aq. dest. und gewann daraus ein braunes, bzw. farbloses, durchsichtiges Filtrat.

Ich verwendete von den beiden Sapotoxinen einmal je 0,1 g (mit 24stündiger Wärmebadeinwirkung im Hauptversuche), das andere Mal je 0,01 g (mit 24-, bei der Wiederholung mit 48stündigem Verweilen des Placentagemisches im Wärmebade beim Hauptversuche). Die Kontrollversuche waren entsprechend.

Da, wie erwähnt, das Vorhandensein von Zucker sich in diesem Falle neben größeren Mengen unzersetzten Sapotoxins durch Fehlingsche Lösung nicht gut konstatieren ließ, so habe ich mich auf die Prüfung der hämolytischen Wirkung beschränken müssen und bemerke nur summarisch, daß eine reichliche Zuckerabspaltung ganz sicher in keinem Versuche stattgefunden hat, höchstwahrscheinlich war sogar überhaupt keine Zuckerabspaltung eingetreten.

Zum Zwecke des Nachweises der hämolytischen Kraft meines Glykosides bzw. meiner glykosidhaltigen Extrakte habe ich aus Placentablut durch Verdünnen (mit 0,9%iger NaCl-Lösung) und Zentrifugieren die roten Blutkörperchen isoliert und diese dann durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung zu einer 1%igen Mischung aufgeschwemmt. Zu je 5 ccm dieser Suspension setzte ich jedesmal 1 ccm (entsprechend 0,01 bzw. 0,001 g Sapotoxin) des aus den Versuchen erhaltenen Filtrates, welches auf Sapotoxin geprüft werden sollte.

Es stellte sich heraus:

1. bei dem Kontrollversuche ohne Placentabrei, nur mit physiologischer NaCl-Lösung und den genannten Mengen meiner beiden Saponinsubstanzen trat die Hämolyse sofort ein;

---

[1]) l. c.

2. bei dem Kontrollversuche mit Placentabrei ohne Wärmebadeinwirkung trat dagegen gar keine Hämolyse ein. Lassen wir einmal das Ergebnis des Versuches mit Wärmebadeinwirkung zunächst noch beiseite und besprechen wir vorstehendes Ergebnis. In Worten ausgedrückt lautet dies: Der Placentabrei ist imstande, schon ohne Erwärmen pro 50 g Placenta die beträchtliche Menge von 10 mg Sapotoxin völlig zu entgiften. Wir wissen nämlich, daß bei allen Saponinsubstanzen mit dem Schwund der Hämolyse auch alle anderen Giftwirkungen verloren gehen, während z. B. bei den agglutinierenden Pflanzengiften mit dem Verlust der Wirkung auf Blutkörperchen keineswegs ein Verlust der sonstigen Giftwirkungen verbunden zu sein braucht. Wie ist nun diese Entgiftung zustande gekommen? A priori sind zwei Möglichkeiten vorhanden, nämlich entweder durch Spaltung in unwirksame Komponenten oder durch Verankerung der toxophoren Gruppe des Sapotoxinmoleküls. Wir wissen durch Ransom sowie durch Kobert, daß alle Saponinsubstanzen durch Verankerung an Cholesterin entgiftet werden. Da die Placenta, wie ich früher nachgewiesen habe, Cholesterin enthält, ist diese Erklärungsweise zunächst heranzuziehen. Nun läßt sich aber diese Bindung bei vielen Saponinen rückgängig machen durch Extraktion der getrockneten Verbindung mit Äther. In der Tat gelang es mir nun, durch Trocknen des unwirksamen Gemisches und Extraktion des Trockrückstandes mit Äther die Unwirksamkeit der mit Äther erschöpften Substanz teilweise wieder zu beseitigen. Die in physiologischer ClNa-Lösung gelöste Substanz zeigte nämlich jetzt wieder hämolytische Wirkung, wenn auch nicht so starke als das reine Sapotoxin. Hätte ich die Ätherextraktion mehrmals wiederholt, so würde die Giftwirkung wohl noch stärker geworden sein. Jedenfalls ist durch meinen Versuch bewiesen, daß der Placentabrei sich dem Sapotoxin gegenüber ganz anders verhält als den vorher besprochenen Glykosiden gegenüber. Jene wurden gespalten; dieses wird verankert, und zwar schon in der Kälte.

3. Nun erst komme ich auf den Versuch, bei welchem der Placentabrei mit dem Sapotoxin in den Wärmeapparat gestellt und hier für 24 bzw. 48 Stunden gelassen wurde. Dabei geht

offenbar ein durch die Wärme begünstigter enzymatischer Spaltungsprozeß vor sich, welche die Sapotoxin-Cholesterinverbindung z. T. wieder zerlegt. Jedenfalls konnte ich bei jedem derartigen Versuche nachweisen, daß im Gegensatz zu der kalt aufgehobenen Portion bei Zusatz von Blutkörperchen zum Zellenfiltrat langsam Hämolyse auftrat. Aber diese Hämolyse erfolgte niemals sofort, sondern erst nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten. Ich glaube daraus schließen zu müssen, daß die Verankerung des Sapotoxins durch das Erwärmen zwar gelockert, aber noch nicht völlig beseitigt worden war. Eine Spaltung des Sapotoxins in Zucker und relativ unwirksame Spaltungsprodukte konnte ich auch bei langdauernder Wärmewirkung in keinem Falle konstatieren.

6. Spaltung von Helleborein.

Helleborein kommt nach Husemann und Marmé[1]) neben Helleborin in der Wurzel und in den Wurzelblättern von Helleborus viridis, H. niger und H. foetidus vor. Es bildet feine weiße Nadeln; ist leicht löslich in Wasser, schwerer in Alkohol, gar nicht in Äther. Seine empirische Formel ist $C_{37}H_{56}O_{18}$. Beim Kochen mit verdünnter Salzsäure wird es gespalten in Helleboretin, Glucose und Essigsäure:

$$C_{37}H_{56}O_{18} + 5H_2O = C_{19}H_{30}O_5 + 2C_6H_{12}O_6 + 3C_2H_4O_2.$$

Das Helleboretin ist von blauer Farbe und nimmt nach Zusatz einiger Tropfen konzentrierter Salpetersäure einen violetten Farbenton an.

Helleborein konnte nach innerlicher Verabreichung bisher weder in den Organen noch im Harn wieder aufgefunden werden. Die nach intravenöser Injektion auftretenden schweren Darmerscheinungen lassen an eine Ausscheidung durch die Darmschleimhaut in umgewandelter Form denken. Nach Prof. Kobert wirkt Helleborein auf Blutkörperchen hämolytisch und ähnelt also den Saponinsubstanzen.

Ich habe zur Prüfung der Placentawirkung mit Mengen von 0,1 und 0,01 g Helleborein (von Merck) meine Versuche

[1]) Annal. d. Chem. u. Pharm. 135, 55.

ganz nach Analogie der bei Amygdalin und Arbutin beschriebenen angestellt. Dauer der Wärmebadeinwirkung im Hauptversuche 24 und 48 Stunden. Keine Ätherextraktion.

Alle Proben ließen mit Fehlingscher Lösung die Zuckerreaktion vermissen. Die Blaufärbung durch Helleboretin war in keinem Falle eingetreten, sondern erschien erst, als ich nachträglich einige Kubikzentimeter des Filtrates mit verdünnter Salzsäure eindampfte. Bei Zusatz von 2 ccm Filtrat zu 5 ccm einer 1 $^0/_0$ igen Blutkörperchenaufschwemmung konnte ich Hämolyse hervorrufen.

Der Versuch mit Subcutaneinspritzung am Frosch von mittlerer Größe ergab den für die Mittel der Digitalingruppe charakteristischen Herzstillstand.

Ergebnis: Placentazellenbrei besitzt, wie ich auf chemischem Wege sowie durch zwei verschiedene pharmakologische Experimente beweisen konnte, nicht die Fähigkeit, Helleborein binnen 24 Stunden im Wärmebad auch nur teilweise zu zerlegen.

7. Spaltung von Strophanthin.

Von Strophanthinen gibt es, je nach der Stammpflanze, aus der es gewonnen wird, verschiedene, nämlich das aus den Samen von Strophanthus gratus dargestellte, weiße Krystalle bildende g-Strophanthin, das aus den Samen von Strophanthus hispidus stammende amorphe h-Strophanthin und weiterhin noch das k-Strophanthin aus Strophanthus Kombé und das e-Strophanthin aus Strophanthus Emini.

Zu den Pharmakopöen der meisten Länder ist leider nur Same und Tinctura Strophanthi offizinell. Die Angaben des Deutschen Arzneibuches über die Spezies, von welcher die Samen genommen sein sollen, bedürfen der Verbesserung. Jedenfalls steht fest, daß die Tinkturen des Handels, auch wenn man nur die besten Firmen berücksichtigt, keineswegs immer gleich stark wirken. Dies liegt zunächst daran, daß die verschiedenen Spezies verschiedene Strophanthine enthalten und daß beim Einkauf der Samen bisher oft Verwechselungen der Spezies vorkamen. Es liegt ferner daran, daß auch die aus derselben Spezies dargestellten Tinkturen keineswegs immer

gleich stark ausfallen, da der Gehalt der Samen an Glykosid schwankt. Vom Standpunkte der exakten Pharmakologie aus verlangt daher Prof. Kobert schon längst, daß man diese Tinkturen ganz fallen läßt und sich an rein dargestellte Strophanthine hält. Von diesen aber muß vom chemischen Standpunkte aus das einzige, welches in großen Krystallen zu gewinnen ist, gegenüber allen amorphen bevorzugt werden. Aus diesem Grunde erwähnt Prof. Kobert in seiner Pharmakotherapie (II. Aufl. 1908) auch nur dieses. Es ist das g-Strophanthin. Versuche, welche er durch Schedel an zahlreichen Herzkranken hat ausführen lassen, haben gezeigt, daß dieses Glykosid alle Anforderungen erfüllt, welche an ein im Sinne der Digitalis wirkendes Ersatzmittel dieser Pflanze gestellt werden können. Aus diesem Grunde habe ich zu meinen Versuchen ebenfalls das krystallisierte g-Strophanthin, welches die Firma Dr. Hillringhaus & Dr. Heilmann in Güstrow zur Verfügung zu stellen die Güte hatte, verwendet und habe mich bei dieser Gelegenheit überzeugt, daß es aus 1 %iger wässeriger Lösung immer wieder in schönen langen Nadeln ausfällt, auch wenn die Lösung zum Sterilisieren erhitzt worden war und dann lange Zeit gestanden hatte. Aus der zu ärztlichen Zwecken einzig und allein in Betracht kommenden 0,1 %igen Lösung fällt es natürlich beim Abkühlen überhaupt nicht wieder aus.

Aus den Strophanthinen entsteht bei der Spaltung mit verdünnten Mineralsäuren das ungiftige Strophanthidin und ein Gemisch verschiedener Zucker, welch letzteres Fehlingsche Lösung reduziert. Die Strophanthine gelten für sehr leicht zersetzliche Glykoside, da sie nach innerlicher und subcutaner Einführung in den Körper, soweit dies bis jetzt feststeht, in den Ausscheidungsprodukten nicht wieder ermittelt werden konnten. Zu dieser Auffassung der leichten Spaltbarkeit stimmt, daß Krause[1]) in „gewissen Diastasen" ein Ferment fand, das imstande ist, kurze Zeit nach der Vergiftung eines Tieres durch Strophanthine die Giftwirkung aufzuheben, indem es das betreffende Strophanthin in unschädliche Komponenten spaltet. Unter solchen Umständen war zu erwarten, daß auch die Placenta mit Leichtigkeit das Strophanthin spaltet. Die nach-

[1]) Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene 11, Heft 20, 1907 u. 10, 105. 1906.

stehenden Versuche sollen zeigen, wie sich dies in Wirklichkeit verhält.

Ich stellte drei Versuchsreihen an: a) mit 0,01 g Strophanthinum crystallisatum von Hillringhaus und Heilmann, b) mit 0,001 g derselben Substanz, c) mit 0,001 g h-Strophanthinum amorphum von derselben Fabrik. (Kontrollversuche nur bei a.)

Ich verfuhr wie beim Amygdalin, d. h. ich machte stets drei Versuche, einen mit 50 g Placentazellenbrei in der Wärme, einen mit Placentabrei in der Kälte und einen ohne Brei nur mit 50 ccm physiologischer ClNa-Lösung. 6 Stunden nach dem Alkoholzusatz wurden alle drei Portionen filtriert, eingedampft und mit 10 ccm Wasser aufgenommen.

Bei a) nahm ich, wie bisher, den Rückstand mit 10 ccm Aq. dest. auf, bei b) und c) dagegen nur mit 5 ccm.

Zur Prüfung, ob das giftige Strophanthin eine Umwandlung erfahren habe oder nicht, injizierte ich von den in a) gewonnenen Filtraten je einem Frosch (Gewicht 60, bzw. 65, bzw. 40 g) subcutan 1 ccm (entsprechend 0,001 g Strophanthin), öffnete nach 15 Minuten die Brust und fand, daß die Herzkammer alsbald in Systole stillstand, wobei die Ventrikelwand infolge der sehr energischen Kontraktion eine weiße Farbe aufwies.

Von den aus b) und c) erhaltenen Filtraten injizierte ich innerhalb 5 Minuten je einem Frosche (Gewicht 45 bzw. 48 g) 4 ccm (entsprechend 0,0008 g Stroph.) unter die Haut, legte wieder nach einer Viertelstunde das Herz frei, das denselben Befund wie oben zeigte.

Es ist wohl mit Sicherheit daraus zu schließen, daß eine Zerlegung dieser beiden Strophanthine durch den Placentabrei nicht stattgefunden hat. Das krystallisierte g-Strophanthin und das amorphe h-Strophanthin sind also spaltenden Einflüssen animalischer Enzyme gegenüber sehr widerstandsfähig. Dies kann uns im Interesse unserer herzkranken Patienten nur freuen, denn es gibt uns die Garantie, daß das ihnen gereichte in milligrammatischer Dose genau dosierte krystallisierte Strophanthin sehr nachhaltig wirken wird.

Das uns hier mehr angehende biochemische Ergebnis aller unserer Versuche mit Glykosiden lautet dahin, daß die menschliche Placenta unzweifelhaft glykosidspaltende Enzyme besitzt, daß jedoch diese Enzyme nicht wahllos jedes beliebige Glykosid spalten, sondern daß jedes überhaupt vorhandene Glykosid in dieser Beziehung einzeln durchgeprüft werden muß. Ich hoffe, daß zu dieser Durchprüfung diese meine Arbeit den Anstoß gibt. Auf die chemische Konfiguration derjenigen Glykoside, welche spaltbar sind, schon jetzt einzugehen, erscheint mir verfrüht. Weitere Publikationen unseres Instituts sollen sich mit dieser Frage beschäftigen.

II. Spaltung von Alkaloiden.

1. Spaltung von Morphin.

Von seiner Entdeckung an bis zum heutigen Tage nimmt das Morphin bezüglich seines Wertes als schmerzstillendes Narkoticum den ersten Rang ein und hat als solches eine überaus ausgebreitete Verwendung gefunden.

Schon sehr früh ist daher das Interesse der Forscher an dem Schicksal, welches dieses wichtigste unserer Alkaloide im tierischen Organismus erleidet, rege geworden und hat zu zahlreichen Untersuchungen Anlaß gegeben.

Vor allem galt es, die Frage zu klären: Wird das Morphin im Körper zersetzt oder nicht? Eine Lösung dieser Frage ist heute bis zu einem gewissen Grade gelungen. Bei akuten Vergiftungen fanden Marmé[1]) und Totze[2]), letzterer unter Kobert, das Alkaloid z. T. unzersetzt im Harne wieder, während Landsberg[3]) und Marquis,[4]) letzterer unter Kobert sowie Faust[5]) neben unverändertem Morphin auch Umwandlungs- bzw. Zersetzungsprodukte desselben nachweisen konnten. Bei früheren Versuchen hatte Donath[6]) weder Morphin noch Dioxymorphin

[1]) Deutsche med. Wochenschr. 1883, Nr. 14.

[2]) Chem.-Zeitg. 1903, Nr. 101.

[3]) Pflügers Archiv 23, 413, 1880.

[4]) Arbeiten des pharmakol. Institutes zu Dorpat 14, 117, 1896.

[5]) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 44, 217, 1900.

[6]) Pflügers Archiv 38, 528, 1886.

im Harn nachweisen können. Die Angaben sind also einander sehr widersprechend, ein Umstand, dessen Erklärung wohl in der Verschiedenheit der Fragestellung, der Versuchsanordnung und der Untersuchungstechnik zu suchen ist.

Bei chronischen Vergiftungen geht nach Marmé[1]) das Morphin z. T. unverändert in den Harn über, z. T. wird es im Organismus vorher umgewandelt, und zwar zu Oxydimorphin oxydiert. Faust[2]) ergänzt diesen Befund dahin, daß die morphinzerstörende Fähigkeit des Körpers sich durch allmähliche Steigerung der Gaben und durch längere Zeit fortgesetzte Verabreichung schließlich so weit vergrößern läßt, daß alles einverleibte Morphin zersetzt wird.

Bemerkenswert sind dann noch einige andere Forschungsergebnisse. Einen Beweis für die Widerstandsfähigkeit des Morphins gegen Leichenfäulnis lieferte Prölß[3]), der das Gift in Leichen noch nach 260 Tagen nachwies. Tauber[4]) stellte fest, daß beim Durchleiten von morphinhaltigem Blut durch überlebende Niere und Leber des Schweines eine Zerlegung nicht stattfindet. Nach Cloetta[5]) geht ein Teil des injizierten Morphins wenigstens zeitweise eine feste Verbindung mit den Lipoiden des Gehirns ein. Auch Babel[6]) fand eine hohe Affinität des Alkaloides zu den Gehirnzellen. Eine Umwandlung des Giftes durch Leberzellenbrei konnte Gonnermann[7]) nur für Hasenleber konstatieren, jedoch nicht für Leber von Hund, Pferd und Fisch. Tierische Exoenzyme sind nach demselben Autor völlig unwirksam. Wie Marquis[8]) feststellte, geht das intravenös eingeführte Morphin als solches bei einer trächtigen Katze schon innerhalb 25 Minuten in sehr deutlich nachweisbaren Mengen in die Placenta und die Embryonen über.

Marquis verdanken wir ein jetzt endlich allgemein anerkanntes, sehr empfindliches Reagens auf Morphin und einige

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) Apoth.-Zeitg. 1901, Nr. 56.
[4]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 27, 336, 1890.
[5]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 50, 453, 1903.
[6]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 52, 262, 1905.
[7]) l. c.
[8]) l. c.

seiner Derivate. Alle Verbesserungen, welche spätere Autoren an diesem Reagens haben anbringen wollen, sind wertlos. Das Reagens besteht aus 2 bis 3 Tropfen Formaldehydum solutum und 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure und ist jedesmal frisch zu bereiten. Zur Anstellung der Probe versetzt man, am besten auf einem Uhrgläschen oder in einer kleinen Porzellanschale, dieses Reagens mit der zu prüfenden eingedunsteten oder pulverigen Substanz. Enthält diese auch nur 0,0001 Morphin, so färbt sie sich zunächst purpurrot, denn violett, um schließlich einen fast reinblauen Farbenton anzunehmen.

Meine Versuche sollten analog den Versuchen mit Glykosiden dartun, ob frische Placentazellen im Wärmebad auf zugesetztes Morphin eine Einwirkung haben oder nicht. Die Ausführung derselben geschah in folgender Weise: 0,1 g Morphinum hydrochloricum wurden mit 50 g Placentabrei, 1 ccm Toluol und 50 ccm 0,9%iger Kochsalzlösung gemischt, und das Gemisch 24 Stunden lang im Wärmebade stehen gelassen; dann wurde das Gemisch mit dem doppelten Volumen 94%igen Alkohols versetzt und nach 6stündigem Stehen bei Zimmertemperatur filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, der Rückstand mit 10 ccm Aq. dest. aufgenommen und wiederum filtriert.

Wiederholungen wurden zuerst mit 0,01 g, dann mit 0,002 g Morphin vorgenommen, je einmal mit 24stündigem, zum zweiten Male mit 48stündigem Verbleiben des Gemisches im Wärmebade.

Zwei Kontrollversuche wurden, wie sonst, zu jedem Hauptversuche angestellt, einer nur mit Morphium + Kochsalzlösung und Wärmebadaufenthalt, der andere mit Morphium + Placentabrei, aber ohne höhere Temperatur, also nur bei Zimmertemperatur.

Da das Filtrat beim Eindunsten einen braunen Rückstand lieferte, so zog ich diesen zwecks weiterer Reinigung mit Chloroform alkalisch aus, dampfte dieses Extrakt dann wieder ein, löste für Reaktion a) in Wasser, für b) aber nicht und stellte nun folgende zwei Reaktionen an.

Die Prüfung auf Morphin wurde in allen Fällen doppelt vorgenommen: a) zu 1 ccm Filtrat wird 1 Tropfen verdünnter Schwefelsäure, 5 bis 6 Tropfen JO_3K-Lösung und 1 ccm Chloroform gesetzt und geschüttelt, wobei bekanntlich letzteres bei

Anwesenheit von Morphin durch abgespaltenes Jod eine purpurrote Farbe annimmt; b) mit der Marquisschen Reaktion.

Beide Reaktionen, sowohl a) als auch b), waren stets positiv, und zwar bei jedem Hauptversuche durchaus im gleichen Grade wie bei den zugehörigen Kontrollversuchen.

Da 50 g frische Placentazellen nicht einmal zwei Milligramm Morphin binnen 48 Stunden ganz zu zersetzen oder auch nur so weit zu vermindern oder umzuwandeln vermochten, daß zwischen der warmen und der kalten Placentaportion ein merkbarer Unterschied eintrat, dürfen wir wohl den Schluß ziehen, daß an der Umwandlung des Morphins im menschlichen Organismus die Placenta unbeteiligt ist.

Mit dieser Tatsache stimmt die klinische Beobachtung überein, daß bei dauernder Aufnahme größerer Mengen Morphins von seiten der Mutter während der Gravidität das neugeborene Kind fast stets Zeichen von chronischer Morphiumvergiftung aufweist.

2. Spaltung von Strychnin.

Das als Krampfgift bekannte Strychnin ist sehr widerstandsfähig gegen Fäulniseinwirkung.

Ob es nach seiner Einführung in den tierischen Organismus nur eine Bindung an gewissen Zellen oder eine Oxydation und Zerlegung erfährt, scheint bisher überhaupt noch nicht endgültig ermittelt worden zu sein. Die Annahme, daß es zu Strychninsäure oxydiert werde, hat sich nicht halten lassen.

Es kann jedoch vom Körper wohl auf andere Weise, nämlich durch Bindung an bestimmte Zellsubstanzen, unschädlich gemacht werden. Über diesen Punkt liegen von verschiedener Seite Beobachtungen vor. Nach Falk[1]) verschwindet von den in den lebenden Organismus eingeführten Mengen von Strychnin ein größerer Teil. v. Czyhlary und Donath[2]) injizierten Meerschweinchen in einen abgebundenen Oberschenkel tödliche Dosen von Strychnin, angeblich mit dem Erfolge, daß nach der 1 bis 4 Stunden darauf erfolgenden Lösung der Umschnürung eine Giftwirkung nicht mehr auftrat. Sie sprachen daher die

[1]) Centralbl. f. med. Wiss. 1899, 481.

[2]) Centralbl. f. inn. Med. 1900, 321.

Ansicht aus, daß durch das Unterhautzellgewebe, die Muskulatur und die in diesen befindliche Blut- und Lymphflüssigkeit das Strychnin in irgend einer Weise in viro gebunden bzw. neutralisiert würde. Meltzer und Langmann[1]) erhoben jedoch schon sehr bald auf Grund ihrer Versuchsresultate Zweifel an der Richtigkeit der Beobachtungen jener beiden Autoren. Brunner[2]) erzielte durch Verreiben des Strychnins mit Gehirnemulsion eine Abschwächung der Giftwirkung. Diese Eigenschaft kommt nach Sano[3]) auch dem Rückenmark zu.

Es wurden von mir, analog den früheren, vier Hauptversuche (nebst Kontrollen) angestellt, zuerst zweimal mit 0,01 g, dann zweimal mit 0,002 g Strychninum nitricum, 50 g Placentabrei (bzw. 50 ccm physiologischer Kochsalzlösung), 1 ccm Toluol, 50 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung. Die Wärmebadeinwirkung währte in jeder Reihe das erstemal 24, das zweitemal 48 Stunden. 1 ccm des Restfiltrates (Lösung in 10 ccm Aq. dest.) entsprach 0,001 bis 0,0002 g Strychnin.

Die Prüfungen wurden folgendermaßen vorgenommen.

1. Chemische Prüfung. 2 ccm des Restfiltrates wurden getrocknet und mit Chloroform extrahiert. Dieses wurde in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade getrocknet, mit etwas konzentrierter Schwefelsäure angefeuchtet, dazu ein Körnchen Kaliumbichromat gebracht und dieses mit einem Glasstabe darin gerieben.

Sowohl bei den Kontrollen wie auch bei den Hauptproben trat Violettfärbung ein, wodurch also das Vorhandensein von Strychnin dargetan wurde. Der Farbenton ist am stärksten bei dem Filtrat, das nur mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen war. Dann folgt der Placentabrei, der bei Zimmertemperatur stand; am schwächsten ist der Farbenton bei dem im Warmen digerierten Placentabrei.

2. Biologische Prüfung. Je 1 ccm des Restfiltrates wurden bei den beiden ersten Versuchen einem Frosche injiziert.

Es traten in allen Fällen nach gewisser Zeit klonische Krämpfe auf, die sehr bald in Tetanus übergingen. Indessen

---

[1]) Ebenda 1900, 929.

[2]) Fortschritte der Medizin 1899, 7.

[3]) Pflügers Archiv 120, 367, 1907.

war der Zeitraum zwischen Injektion und dem ersten Auftreten des Klonus nicht überall gleich.

Das Intervall war am kürzesten (etwa 15 Minuten dauernd) bei dem Filtrat, das nur mit physiologischer Kochsalzlösung ohne Placentabrei gewonnen war (Froschgewicht 48 bzw. 45 g); etwas größer, etwa 20 Minuten umfassend, war es bei der Probe, in welcher der Placentabrei nur in der Kälte eingewirkt hatte (Froschgewicht 42 bzw. 36 g). Am längsten (etwa 30 Minuten) dauerte das Inkubationsstadium nach Injektion des in dem Hauptversuche erhaltenen Filtrates (Froschgewicht 35 bzw. 35 g). Das Auftreten des Krampfes beim Frosch im zweiten Versuche ist analog dem ersten Versuche. Das Filtrat, das nur mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen war, wies einen Intervall auf von ca. 1 Stunde 10 Minuten. Froschgewicht 52 bzw. 67 g. Bei dem Filtrat, welches von dem in der Kälte befindlichen Placentabrei gewonnen wurde, betrug das Intervall ca. 1 Stunde 10 Minuten. Froschgewicht 46 g. Am längsten, ca. 1 Stunde 30 Minuten, war das Intervall bei dem Filtrat, welches im Wärmebade stand. Froschgewicht 61 bzw. 49 g. Dieses Verhalten fand sich übereinstimmend bei beiden Versuchsreihen.

Aus diesen Prüfungen ist somit der Schluß zu ziehen, daß 50 g Placentabrei 2 mg Strychnin zwar nicht vollständig zu binden oder umzuwandeln imstande sind, jedoch in ihrer Wirkung abzuschwächen vermögen.

3. Spaltung von Aconitin.

Aconitin ist ein sehr leicht zersetzliches Alkaloid. Ich erwartete daher, daß auch durch Placentabrei leicht eine entgiftende Spaltung des Giftes herbeigeführt werden würde.

Nach gewohnter Methode ging ich bei meinen Versuchen vor. Ich verwendete sowohl das erstemal als auch bei einer Wiederholung 0,01 g Aconitinum nitricum, 50 g Placentabrei, 1,0 ccm Toluol, 50 ccm 0,9 $^0/_0$ige NaCl-Lösung. Der Wärmebadaufenthalt dauerte beim Hauptversuche und bei der Kontrolle mit nur physiologischer Kochsalzlösung das erstemal 24, das zweitemal 48 Stunden. Bei der anderen Kontrolle ließ ich wieder, wie auch sonst stets, die Wärmebadeinwirkung fort.

Dieselben Versuche habe ich, nur mit dem Unterschied, daß ich die Giftmenge auf 0,002 g Aconitinum nitricum verminderte, wiederholt.

Nach Beendigung des Aufenthaltes im Wärmebad (eine Portion 30 Minuten nach der Zerreibung) wurde der Placentabrei mit 200 ccm Alkohol versetzt, nach 6 Stunden filtriert und das Filtrat zum Trocknen eingedunstet. Der Trockenrückstand wurde in 10 ccm Wasser gelöst und filtriert.

Von den Restfiltraten wurde das erstemal je 1 ccm (entsprechend 0,001 g Aconitin) einem Frosche subcutan injiziert. Nach 20 bis 30 Minuten war bei allen Fröschen bereits vollkommene Lähmung der Nerven der ganzen Körpermuskulatur eingetreten. Wie beim Strychnin (s. oben) so zeigte sich auch hier die Giftwirkung zuerst bei dem Filtrate aus den nur mit physiologischer Kochsalzlösung angestellten Kontrollen (Froschgewicht 45 bzw. 43 g). Etwas später trat die Lähmung auf bei dem aus den anderen Kontrollen (Placentabrei bei Zimmertemperatur gehalten) gewonnenen Filtrate (Froschgewicht 42 bzw. 38 g). Die längste Zeit verstrich zwischen Injektion und dem Auftreten der ersten Vergiftungserscheinungen bei dem aus den beiden Hauptversuchen erhaltenen Filtrate. Bei den Versuchen mit 0,002 g Aconitin habe ich 2 ccm Restfiltrat (entsprechend 0,0004 g Aconitin) injiziert. Die Lähmung des Frosches trat analog den ersten Versuchsreihen ein. Bei der Injektion des nur mit Kochsalzlösung gewonnenen Filtrates erfolgte die Lähmung nach ca. 50 Min. (Froschgewicht 60 bzw. 70 g), bei dem Filtrat aus dem bei Zimmertemperatur gehaltenen Placentabrei nach ca. 1 Stunde (Froschgewicht 50 g), bei dem Filtrat des Hauptversuches nach ca. 1 Stunde 20 Min. (Froschgewicht 48 bzw. 52 g).

In meiner Erwartung, eine völlige Zerlegung des Alkaloides erzielen zu können, sah ich mich also getäuscht. Aus meinen Versuchen kann ich jedoch wenigstens folgern, daß beim Kontakt von 2 mg Aconitin mit 50 g Placentabrei eine Abschwächung der Wirkung des Aconitins insofern eingetreten ist, als die Wirkung sich langsamer entwickelte. Dies stimmt zu den Ergebnissen mit Strychnin.

III. Spaltung von Estern.

1. Spaltung von Salol.

Daß Salol, d. h. der Salicylsäure-Phenylester ($C_6H_4 . OH . COO . C_6H_5$), im Darmkanale unter Salicylsäureabspaltung zerlegt wird, ist seit 1886 bekannt. Den Beweis, daß diese Spaltung nicht durch alle Organe, sondern nur durch Organbrei gewisser Organe ausgeführt wird, hat zuerst Willenz[1]) unter Prof. Kobert geführt und gefunden, daß Leber und Niere gewisser Tiere Salol spalten, Muskeln jedoch nicht. So lag es für mich nahe, auch durch Einwirkenlassen von Placentabrei eine Zerlegung der Substanz in analoger Weise zu versuchen.

Wie bei den vorigen Versuchen wurden 0,5 g Salol mit 50 g Placentabrei, 1 ccm Toluol, 50 ccm 0,9°/₀iger NaCl-Lösung verrieben und dieses Gemisch für 24 Stunden ins Wärmebad gebracht. Danach wurde es mit dem doppelten Volumen Alkohol (94°/₀) versetzt, nach 6 Stunden (Zimmertemperatur) filtriert, das Filtrat auf dem Wasserbade getrocknet, dieser Rückstand mit 10 ccm Aq. dest. aufgenommen und wiederum filtriert (Filtrat I).

Kontrollproben wurden einerseits nur mit physiologischer Kochsalzlösung, andrerseits mit Placentabrei und ohne Verweilen im Wärmebade angestellt; im übrigen werden sie genau wie die Hauptprobe behandelt (Filtrat II und III).

Die Versuche wurden dann noch einmal, und zwar in genau gleicher Weise wiederholt. Die Prüfung der Filtrate mittels Salicylsäurereaktionen ergab:

1. Eisenchlorid färbte das Filtrat I, selbst wenn dieses 20fach verdünnt wurde, noch tief violett. Die 20fach verdünnten Filtrate II und III wurden nur ganz schwach gefärbt.

Beim Erwärmen mit Millons Reagens färbte sich Filtrat I intensiv blutrot; diesen Farbenton zeigte auch noch das 20fach verdünnte Filtrat I bei dieser Probe. Filtrat II und III dagegen wurden sowohl in unverdünntem als auch in 20fach verdünntem Zustande nur bräunlich gefärbt.

Ergebnis: Salol wird durch die in der menschlichen Placenta enthaltenen ungeformten Fermente in be-

[1]) Chem.-Ztg. 1887, 11, Nr. 96.

trächtlichen Mengen unter Abspaltung von Salicylsäure zerlegt. Die bei den Kontrollen eingetretene geringe Zerlegung ist wohl lediglich der bei den nötigen Manipulationen unvermeidlich vor sich gehenden minimalen Spaltung zuzuschreiben, läßt sich auch nicht im entferntesten mit dem durch den erwärmten Plazentabrei erzielten Resultate vergleichen.

Vergleichsweise prüfte ich noch Kaninchenorgane auf ihr Spaltungsvermögen dem Salol gegenüber. Ich digerierte 24 Stunden hindurch im Wärmebade Portionen von 30 g Leber, 11 g Nieren, 8 g Gehirn, 30 g Muskeln mit je 0,2 g Salol + 1% Toluol + 30 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung und behandelte im übrigen die Proben wie das Placentagemisch. Auch die Prüfungen wurden analog ausgeführt.

Resultat: Leber-, Nieren-, Gehirnsubstanz, die sämtlich von Kaninchen stammten, spalteten Salol; Muskelsubstanz spaltete nicht. Da in diesem Versuche bei Muskelsubstanz keine Spaltung eintrat, ist bewiesen, daß die von mir ausgeführten Prozeduren, also auch das Erwärmen, allein für sich die Spaltung nicht ausführen. Daß Leber und Niere Salol spalten, hat, wie schon oben erwähnt wurde, Prof. Kobert bereits vor mehr als 20 Jahren durch Willenz feststellen lassen. Die Placenta reiht sich diesen drüsigen Organen wie in bezug auf die Glykosidspaltung so auch in bezug auf Salolspaltung an.

2. Spaltung von Tannigen.

Das bei akuten und besonders bei chronischen Diarrhöen mit gutem Erfolge verwendete Tannigen ist der Diacetylester des Tannins und hat die Formel $C_{14}H_8(C_2H_3O)O_9$. Seine adstringierende Wirkung auf die Darmschleimhaut ist dem durch Zersetzung frei werdenden Tannin zuzuschreiben.

Ich versuchte nun, auch durch Placentabrei eine derartige Tanninabspaltung herbeizuführen.

Meine Versuche mit 0,5 g Tannigen, sämtlich je einmal wiederholt, waren genau so wie beim Salol, nur mit dem Unterschiede, daß ich zum Aufnehmen des Trockenrückstandes dieses Mal je 20 ccm Aq. dest. benutzte.

Die Prüfung der Filtrate beschränkte sich bisher meist auf Feststellung der Tanninreaktion. Ich habe noch eine zweite

Reaktion, die ich in Bücher nicht finden konnte, zum Nachweis der eingetretenen Spaltung des Tannigens benutzt, nämlich eine Rotfärbung bei Zusatz von Jodjodkalium. Diese Reaktion ist sehr schön, aber hält nur sehr kurze Zeit an. Worauf sie beruht, ist mir noch nicht ganz klar. Hier ist nur von Interesse zu wissen, daß das ungespaltene Tannigen sie niemals gab, das von der Placenta gespaltene aber stets. Tannin, Gallussäure und Essigsäure geben einzeln diese Reaktion nicht.

1. Reaktion mit Eisenchlorid. Zu je 1 ccm der Filtrate wird 1 Tropfen Eisenchloridlösung zugesetzt. In Filtrat I (Placentabrei 24 Stunden im Wärmebad) entsteht sofort eine intensive dunkelviolette Färbung. Bei längerem Stehen senken sich tiefviolette Partikelchen zu Boden, und oben scheidet sich eine klare, fast farblose Flüssigkeit ab. Filtrat I (nur Kochsalzlösung) verfärbt sich bloß grün; diese Grünfärbung bleibt auch bei längerem Stehenlassen gleichmäßig auf die ganze Flüssigkeit ausgedehnt; ein Niederschlag bildet sich nicht. Filtrat III (Placentabrei bei Zimmertemperatur) verhält sich ähnlich wie I, nur ist die Violettfärbung weniger intensiv, der nach einiger Zeit sich absetzende Niederschlag ist viel geringer, auch behält die ganze Flüssigkeit ihren violetten Farbenton bei.

2. Reaktion mit Jodjodkaliumlösung. Je 1 ccm der Filtrate wurde mit 5 ccm Aq. dest. verdünnt. Dann wurde ein Tropfen Jodjodkaliumlösung hineingetropft. Filtrat I nimmt sofort eine schöne rote Farbe an, die nach einigen Minuten in einen leicht gelblichen Farbenton übergeht. In Filtrat II entsteht von vornherein eine rein gelbe Färbung ohne den geringsten rötlichen Schimmer. Filtrat III verhält sich wie I.

Ergebnis: Tannigen wird durch Placentabrei leicht und reichlich zerlegt, und zwar ist zum Zustandekommen dieser Spaltung eine Einwirkung von Bruttemperatur nicht einmal erforderlich, sondern die Umwandlung vollzieht sich schon bei Zimmertemperatur, hier aber natürlich in geringerem Grade als bei erhöhter Temperatur.

Ich habe Salol und Tannigen als Repräsentanten der Gruppe der aromatischen Ester benutzt. Ich glaube aus diesen zwei Versuchsreihen folgern zu können, daß die Placenta auch Estern gegenüber sich analog wie die Leber

verhält, d. h. gewisse Ester verseift. Welche Gruppen der Ester dies sind, bedarf weiterer Untersuchung.

IV. Einiges über Zusammensetzung und Wirkung des Placentapreßsaftes und des Placentaextraktes.

Ich möchte betreffs des hier folgenden Abschnittes im voraus bemerken, daß man im letzten Jahrzehnt allerlei Wirkungen der Placenta zugeschrieben und allerlei Giftstoffe in ihr gefunden hat. Vor der nüchternen Kritik kann dies nicht alles bestehen. Jede — auch negative — Untersuchung auf diesem Gebiete scheint mir, falls sie richtig ausgeführt ist, von Nutzen zu sein. Unter diesem Gesichtswinkel bitte ich das Nachstehende zu betrachten.

1. Hat die Placenta eine Giftwirkung?

Seit van der Hoeven[1]) 1896 als Ätiologie der Eklampsie eine Toxämie der Mutter, die durch die Stoffwechselprodukte des Foetus beim Eintritt in das mütterliche Blut zustande kommt, aufgestellt hat, neigen viele Autoren dieser Toxintheorie zu. Knapp[2]) erklärt die Pathogenese der Eklampsie ebenfalls durch ein Gift, weil die Symptome der Eklampsie ganz ähnlich sind wie die der Strychninvergiftung. Unabhängig davon ist Fehling[3]) zu der Ansicht gekommen, daß der Erreger der Blutgerinnung bei der Eklampsie in einem Stoffwechselprodukte des foetalen Organismus zu suchen sei. Nach Czempin[4]) tritt gegen Ende der Schwangerschaft eine Überlastung der Placenta mit regressiven Stoffwechselprodukten des Foetus ein. Die Placenta entfaltet dabei dauernd, vornehmlich durch Aufspeicherung dieser Produkte, eine entgiftende Tätigkeit. Bei einer Mehraufnahme von regressiven Stoffen kann die Placenta aber diese entgiftende Wirkung nicht mehr vollständig leisten; die foetalen Stoffe treten dann in das mütterliche Blut über, und so kommt die Eklampsie zustande.

---

[1]) Die Ätiologie der Eklampsie. Inaug.-Diss. Leiden 1896. Ref. Centralbl. f. Gyn. 1900, 70 u. 616.

[2]) Centralbl. f. Gyn. 1900, 423.

[3]) Verhdl. d. Deutsch. Ges. f. Gyn. 1901, 239.

[4]) Centralbl. f. Gyn. 1901, 593.

Von den erwähnten Autoren werden also übereinstimmend die von dem Foetus gebildeten Toxine als kausales Moment für das Zustandekommen der Eklampsie angesprochen. Daneben existiert aber noch eine andere Theorie, und zwar ebenfalls eine Toxintheorie zur Erklärung der Krankheitsentstehung. Die Giftwirkung geht danach nicht von den Stoffen des Foetus aus, sondern redet von Giftstoffen der Placenta. Schmorl[1]) sah bei der Sektion eklamptischer Leichen neben degenerativen Veränderungen der Organe stets multiple Thrombenbildung. Er vermutet, daß diese die Folge ist von einem Gift. Außerdem fand er bei Eklampsie in der Lunge Embolie durch verschleppte Placentazellen. Veit[2]) bestätigt, daß bei Intra- und Extrauterinschwangerschaft Chorionzotten oder Zottenbestandteile vom intervillösen Raum ziemlich entfernt und in die Venen deportiert waren. Poten[3]) gibt an, daß abgerissene Chorionzotten oder deren Epithel sehr häufig in die mütterlichen Blutbahnen verschleppt werden, und zwar nicht nur bei Eklampsie, sondern vielleicht bei jeder Schwangerschaft. Veit und sein Schüler Scholten[4]) haben die Seitenkettentheorie auf einige Vorgänge bei der Schwangerschaft angewandt; sie haben angenommen, daß die deportierten Zottenzellen durch ihr Cytotoxin im mütterlichen Blut die Bildung eines Gegengiftes (Cytolysin) hervorrufen, welches die eingedrungenen Zottenzellen auflöst und von ihnen daher Syncytiolysin genannt wird. Ascoli[5]) bestätigt durch Tierversuche, daß Syncytiolysin in zu großen Mengen schwere nervöse Erscheinungen auslöst, welche in Koma und Konvulsionen sich äußern und zu einem letalen Ausgange führen können. Auf Grund experimenteller Studien über die Eklampsie sind Weichardt und Piltz[6]) zu folgendem Resultat gekommen: Durch Cytolyse seitens der in die Blutbahn gelangenden Placentabestandteile wird eine toxische Substanz gebildet, durch welche die Eklampsie

[1]) Verhdl. d. Deutsch. Ges. f. Gyn. 1901, 303 und Centralbl. f. Gyn. 1905, 129.

[2]) Zeitschr. f. Geb. u. Gyn. 44, 466, 1901.

[3]) Arch. f. Gyn. 66, 590, 1902.

[4]) Centralbl. f. Gyn. 1902, 169 und Zeitschr. f. Geb. u. Gyn. 49, 210, 1903.

[5]) Centralbl. f. Gyn. 1902, 1321.

[6]) Deutsche med. Wochenschrift 1902, Nr. 35 und 1906, 46, 1854.

veranlaßt wird, wenn im Blute der Schwangeren antitoxische oder hemmende Bestandteile nicht in genügender Menge vorhanden sind. Diese Versuche von Weichardt und Piltz sind von Freund[1]) durch Tierexperimente bestätigt worden. Er hält die toxische Substanz für ein Plasmagift, das an den suspendierten Partikelchen der Zottenepithelien festhaftet und von diesen nicht getrennt werden kann, da die durch Filtration oder Zentrifugieren gewonnene Flüssigkeit kein Gift enthält. Den Preßsaft fand er bei subcutaner oder intraperitonealer Injektion unwirksam. Bei intraperitonealer Injektion der mittels Kochsalzlösung hergestellten Aufschwemmung eines Pulvers, das aus Placenten von eklamptischen Gebärenden gewonnen war, hat Liepmann[2]) deutliche Intoxikationserscheinungen gesehen. Von Freund und Mohr[3]) ist in der Placenta ferner ein hämolytisches Gift gefunden worden, nämlich ölsaures Natrium. Fellner[4]) ist sogar der Ansicht, daß Hyperemesis, Eklampsie, Icterus gravidarum, Osteomalacie, Psychose usw. auf Schwangerschaftsvergiftungen beruhen, bei denen die Quelle der Toxinbildung in der Placenta zu suchen ist.

Wohl in Einklang zu bringen mit diesen Toxintheorien für die Eklampsie sind die Ergebnisse, die Martin, Lichtenstein und Mathes durch Versuche mit Placenten erzielten. Ersterer[5]) injizierte Kaninchen isogenen Placentapreßsaft, welcher durch Zentrifugieren von corpusculären Elementen befreit war, mit dem Erfolge, daß keine toxische Wirkung auftrat. Lichtenstein[6]) beobachtete, daß nach intravenöser Injektion einer Kochsalzlösung, die durch Sieb „F 6"[7]) durchgetriebene Placentazottentrümmer (von normalen Placenten sowohl wie von eklamptischen) suspendiert enthielt, kein Tier verendete, während eine mit „F 5" durchgesiebte Placentaaufschwemmung bei sämt-

[1]) Centralbl. f. Gyn. 1907, 777 und Verhdl. d. Deutsch. Ges. f. Gyn. 1907, 406.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1905, 688 u. 2484.

[3]) Centralbl. f. Gyn. 1908, 1418.

[4]) Monatsschr. f. Gyn. 1908, 1548.

[5]) Monatsschr. f. Geb. u. Gyn. 24, 590, 1906.

[6]) Arch. f. Gyn. 86, 434, 1908.

[7]) „F 5" und „F 6" bezeichnen die Feinheit der Maschen der Lichtensteinschen Siebe.

lichen zwölf Versuchen tötend wirkte. Bei seinen Kontrollen durch Argillamischung erhielt er ein gleiches Resultat, d. h. alle Erscheinungen waren nur mechanisch durch die Größe der Partikelchen bedingt. Nach Mathes[1]) vermochte ein Kaninchen (von 2900 g), dem innerhalb 30 Minuten 40 ccm eines durch die Buchnersche Bakterienpresse hergestellten Placentapreßsaftes ganz langsam und ohne Druck injiziert wurden, diese und wahrscheinlich auch eine noch größere Menge anstandslos zu vertragen. Dagegen reichten bei einer Injektion unter Druck schon 5 ccm aus, um ein Tier von 2450 g zu töten; bei der Sektion derselben fanden sich im Herzen zahlreiche festhaftende Blutgerinnsel.

Nach allem Obigen scheint die Annahme nicht unberechtigt, daß die Eklampsie eine Vergiftung als Ursache hat, denn in ihren Symptomen und auch in den Sektionsbefunden sind hierfür viele Anhaltspunkte gegeben. Nun erhebt sich allerdings die große Frage: Woher kommt das Toxin? Auf Grund der Tatsache, daß wir auch bei Blasenmole[2]) und bei macerierter Frucht[3]) Eklampsie beobachtet haben,[4]) ferner in Rechnung ziehend, daß die Placenta ein Organ ist, welches gewissermaßen der Verkehrsvermittelung zwischen Mutter und Foetus dient, welches zahlreiche verschiedene Fermente enthält und welches in seinen Syncytialzellen Gebilde von ganz besonderen Fähigkeiten besitzt, möchte ich die Vermutung aussprechen, daß die Eklampsietoxine unter Umständen von der Placenta ihren Ursprung nehmen können. Daß aber die normale Placenta giftige Substanzen enthält oder produziert, möchte ich bezweifeln.

Ich habe bereits im Sommer 1908 in Japan einem Hunde 50 ccm eines bloß durch ein Linnentuch filtrierten Placentapreßsaftes subcutan injiziert und in Übereinstimmung mit

---

[1]) Centralbl. f. Gyn. 1908, 1548.

[2]) Heitschmann, Centralbl. f. Gyn. 1904, 1089.

[3]) Liepmann, Centralbl. f. Gyn. 1906, 59.

[4]) Ich habe selbst im Sept. 1905 in Japan einen derartigen Fall beobachtet. Bei einer I-para, der Frau eines Arztes, trat im zehnten Monat der Gravidität plötzlich Eklampsie auf. Der Gatte hatte schon vorher starkes Oedem an der unteren Körperhälfte, Albuminurie und Sehschwäche konstatiert. Seit 4 Tagen fehlten die Kindsbewegungen und kindlichen Herztöne. Das von mir extrahierte Kind war maceriert.

Freund gar keine Erscheinungen einer Vergiftung herbeiführen können. Bei Benutzung sowohl einer normalen als auch einer eklamptischen Placenta war das Ergebnis ganz dasselbe.

Dieses Resultat ist leicht zu erklären: Die normale Placenta enthält kein Gift; das Gift der eklamptischen Placenta ist an die Chorionzotten gebunden, gelangt bei subcutaner Injektion daher nicht ins Blut und wird anscheinend durch das Subcutangewebe unschädlich gemacht. Bei der Eklampsie dagegen gelangt ja das Gift direkt ins Blut. Deshalb sind nur Versuche mit intravenöser Injektion zu bewerten. Aber gerade hier ergeben sich Schwierigkeiten. Verwendet man ein unklares, Gewebepartikel enthaltendes Filtrat, so wirken diese schon rein mechanisch, durch Erzeugung von Blutgerinnung und Lungenembolie, schädigend oder tötend. Benutzt man dagegen ein ganz klares, von Formbestandteilen freies Filtrat, so fehlen darin wahrscheinlich wieder die an die Chorionzotten gebundenen Toxine.

Im Anschluß an meine bereits geschilderten Versuche über die spaltende Wirkung der Placenta habe ich im Rostocker pharmakologischen Institut auch über die Giftwirkung der normalen Placenta einige Versuche angestellt.

1. Frisch geborene menschliche Placenta wurde nach oben angegebener Methode vom anhaftenden Blut befreit, durch eine Fleischhackmaschine getrieben, in einer Reibschale mit Hilfe von Glaspulver fein zerrieben. Der feine Brei wurde in einem Leinentuch mittels einer Preßmaschine ausgepreßt, der Preßsaft durch ein Porzellanfilter unter Druck filtriert und nun eine fleischwasserfarbene, ganz klare Flüssigkeit A erhalten.

2. 300 g Placentabrei wurde mit 900 ccm Alkohol (94%) unter öfterem Umrühren 48 Stunden lang ausgezogen und filtriert. Der Abdampfungsrückstand des Filtrates wird mit 30 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung aufgenommen und wiederum filtriert. Die jetzt gewonnene Flüssigkeit B ist klar und von dunkelbrauner Farbe.

Zu jedem der folgenden Versuche wurden immer wieder andere frische Placenten verwendet.

Als Versuchstiere wählte ich Kaninchen. Die Injektion geschah mittels Pravazspritze in eine Ohrrandvene, und zwar mit peinlichster Vorsicht und so langsam, daß eine Einspritzung

etwa 5 bis 7 Minuten in Anspruch nahm. Ich spritzte zunächst von der Flüssigkeit A ein, und als sich hiernach (cf. untenstehende Tabelle) trotz sorgfältigster Beobachtung keine Wirkung wahrnehmen ließ, nahm ich nach mehr als 24 Stunden die Injektion der Flüssigkeit B vor.

Geschlecht	Gewicht g	Gravidität	Injizierte Menge (ccm) der Flüssigkeit		Resultat
			A	B	
♂	1700	—	6	4	keine Wirkung
♀	2500	—	8	4	keine Wirkung
♀	2300	—	8	4	keine Wirkung
♀	3200	+	6	6	keine Wirkung
♀	3500	+	5	6	nach 9 Stunden geboren

Diese Versuche lieferten also mit Sicherheit die Bestätigung, daß von der normalen Placenta weder der klare Preßsaft noch die durch Alkoholextraktion gewinnbaren wasserlöslichen Stoffe eine toxische Wirkung auf den tierischen Organismus ausüben.

2. Existiert eine anregende Wirkung einer Placentarsubstanz auf die Uteruskontraktionen?

Als allerwichtigstes Organ für das Leben und für die Entwicklung des Foetus verrichtet die Placenta ganz allein eine Reihe der bedeutsamsten Lebensfunktionen, wie Atmung, Ernährung und Ausscheidung, die im Extrauterinleben von verschiedenen, eigens dazu vorhandenen Organen besorgt werden. Aber spielt die Placenta einzig und allein für den Foetus eine Rolle?

Ein Blick ins Säugetierreich lehrt uns gleich die Tatsache kennen, daß manche Muttertiere unmittelbar nach der Geburt ihrer Jungen die Nachgeburt fressen. Dann sieht man sie, unbeschadet des soeben überstandenen Prozesses, gesund und munter fressen und umherlaufen. Die menschliche Wöchnerin

dagegen, die doch die von ihr geborene Placenta nicht verspeist, muß, stark angegriffen und geschwächt, ein paar Tage oder selbst wochenlang das Bett hüten. Besonders interessant ist es, daß auch bei Herbivoren, wie Pferd, Kuh, Schaf, Kaninchen usw., die doch gewöhnlich animalische Kost verschmähen, die Muttertiere die Nachgeburt sofort und gründlich verzehren. Diese instinktive Handlung der Tiere wird natürlich wohl ihren Zweck haben, und ich bin beim Nachdenken darüber zu der wohl nicht absurden Meinung gelangt, daß es für das Tier von gewissen Vorteilen ist, die Placenta wieder zu sich zu nehmen. Diese kann ihm einerseits als nahrhafte Speise zur schnellen Erholung nach der die Kraft erschöpfenden Geburtstätigkeit dienen, und andrerseits hat sie das Vermögen, die durch Schwangerschaft und Geburt veränderten Organe schnell und vollkommen zur Regeneration zu bringen, vor allem also die Kontraktion und Rückbildung des Uterus anzuregen oder zu bewirken. Dixon und Taylor[1]) wollen in der Tat durch Injektion der Lösung des Alkoholextraktes der Placenta in Salzwasser Kontraktionen des schwangeren Uterus ausgelöst haben. Diese Versuche und die vorstehende Betrachtung brachten mich darauf, auch bei trächtigen Tieren zu versuchen, durch Einführen von reifer Placenta Uteruskontraktionen auszulösen.

Versuch 1.

Ich injizierte einem hochträchtigen Kaninchen von 3500 g Gewicht 5 ccm menschlichen Placentapreßsaft, Flüssigkeit A (cf. vorigen Abschnitt), in eine Ohrvene. Keine Wirkung. Nach 24 Stunden spritzte ich demselben Tiere dann noch 6 ccm der durch Alkoholextraktion aus Placentagewebe gewonnenen Flüssigkeit (B des vorigen Kapitels) intravenös ein. 9 Stunden später warf das Kaninchen sechs Junge.

Versuch 2.

Einem hochträchtigen Kaninchen von 3200 g Gewicht wurden zunächst 6 ccm Preßsaftflüssigkeit (A), dann, als keine Erscheinungen auftraten, 24 Stunden später 6 ccm Alkoholextrakt-

---

[1]) The Lancet, 1908 Oct. 26, S. 1158; Ref. Jahresber. d. Geb. u. Gyn. 21, 477, 1908.

flüssigkeit (B) in eine Ohrvene injiziert. Überhaupt keine Wirkung.

Diese Versuche liefern nicht nur keinen Beweis für meine oben erwähnte Hypothese, sondern müssen eher als Gegenbeweis gedeutet werden, denn das Eintreten der Geburt im ersten Versuche ist wohl kaum in Zusammenhang mit den Injektionen zu bringen, sondern wäre wahrscheinlich auch ohne diese erfolgt.

Aber ein anderer Umstand war noch in Betracht zu ziehen. Es könnte ja sein, daß gerade das Verdautwerden, wie dies doch bei der von dem Tiere gefressenen Placenta geschieht, ein wesentlicher Faktor ist für eine Entfaltung der Wirksamkeit der in dieser enthaltenen Substanzen, sei es, daß durch die Verdauung diese Stoffe frei und resorptionsfähig gemacht werden, sei es, daß erst im Digestionstraktus diese Stoffe aus anderen in dem Mutterkuchen enthaltenen gebildet werden, um darauf zur Resorption zu gelangen. Dann wäre also das Versagen der Injektionsflüssigkeiten in meinen Versuchen leicht zu verstehen.

Um mich von der Richtigkeit meiner Schlüsse zu überzeugen, stellte ich folgenden Versuch an:

Von einem frisch geschlachteten, tragenden Kaninchen, dessen Foeten im Gewichte von 27 bis 30 g fast reif waren, wurden die sechs Placenten mitsamt dem Fruchtwasser zu einem feinen Brei (im ganzen 40 ccm) zerrieben und dieser vermittels eines dünnen Oesophaguskatheters einem anderen tragenden Kaninchen, das ich einen Tag lang hatte hungern lassen, in den Magen eingebracht. Erbrechen erfolgte nicht. Aber auch dieses Mal traten keine Erscheinungen auf, welche als Uterusbewegungen oder deren Folgen hätten angesprochen werden können. Also auch die innerlich verabfolgte arteigene Placenta hat bei Kaninchen keine Kontraktionen der Gebärmutter zur Folge.

Vielleicht ist ein Teil meines Mißerfolges — so werden die Gegner sagen — dem zuzuschreiben, daß das Tier noch zu weit vom Endtermine der Schwangerschaft entfernt war. Jedenfalls werde ich bei Gelegenheit die Versuche in dieser Richtung fortsetzen und hoffe, dadurch endgültige Klarheit in diese Frage zu bringen.

3. Enthält die Placenta eine blutdrucksteigernde Substanz?

Bei seinen an Hunden vorgenommenen Versuchen fand Weymeersch[1]) nach Injektion eines mit physiologischer Kochsalzlösung aus Placenta hergestellten Extraktes stets zu Anfang eine deutliche Erniedrigung des Blutdrucks bei Beschleunigung der Herzaktion. Das Sinken des Blutdruckes beruht nach seiner Ansicht auf einer Gefäßerweiterung. Bei Wiederholung der Einspritzungen zeigte sich die Wirkung weniger deutlich; die Tiere schienen sich an das wenig giftige, die Blutgerinnung verhindernde Extrakt leicht zu gewöhnen. Dabei wurde zwischen den Extrakten von Placenten gesunder und kranker Gebärenden kein Unterschied gefunden.

Im Gegensatz zu diesem Resultat steht das von Dixon und Taylor[2]). Diese extrahierten zerkleinerte frische Placenta mit absolutem Alkohol und nahmen den Abdampfungsrückstand dieses Auszuges mit Salzwasser auf. Nach intravenöser Injektion dieser Flüssigkeit bei Katzen, Kaninchen und Hunden sahen sie nach rasch vorübergehendem Sinken ein auffälliges Ansteigen des Blutdruckes, ähnlich wie beim Adrenalin, dessen Wirkung in der Hauptsache auf einer Kontraktion der peripheren Arterien beruht.

Es war mir von Interesse, eine Klärung dieser Widersprüche herbeizuführen.

Bei einem Kaninchen befestigte ich in der Carotis sin. eine mit 25%iger Magnesiumsulfatlösung gefüllte Kanüle und brachte diese in Verbindung mit einem Quecksilbermanometer, dessen Schwankungen durch eine Übertragung auf einem um eine rotierende Trommel gespannten berußten Papier aufgezeichnet wurden. Die Vorrichtung wurde in Tätigkeit gesetzt und dann dem Tiere in die rechte Ohrrandvene die Flüssigkeit (B) injiziert, die aus dem Verdunstungsrückstande des Alkoholextraktes einer menschlichen Placenta durch Aufschwemmen mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt war.

Kaninchen I (1700 g ♂).

Bei diesem Versuche wurde die Schreibvorrichtung des

---

[1]) Bull. de la Soc. Royale des sciences méd. et nat. Ref. Münch. med. Wochenschr. 1904, 2445.

[2]) l. c.

Kymographions nicht benutzt, sondern die Höhe der Quecksilbersäule direkt durch Anlegen eines Maßstabes gemessen. Die Druckhöhe beträgt vor der Injektion 90 mm. Nach der ersten Injektion (2 ccm) sinkt die Säule sofort auf 38 mm herab; darauf erfolgt innerhalb der nächsten 3 Minuten ein Anstieg um 74 mm. Eine jetzt ausgeführte zweite Injektion (2 ccm) verursacht wieder einen Abfall, der zunächst schnell, dann langsamer aber stetig vor sich geht, bis nach 3 Minuten, also insgesamt 6 Minuten seit der ersten Injektion, der Tod des Tieres eintritt.

Befund bei der sofortigen Sektion: Keine Organveränderungen; Blut im Herzen nicht geronnen; Urin eiweißhaltig.

Die Todesursache ist wahrscheinlich eine Vergiftung mit 25%igem Magnesiumsulfat, das beim Absinken des Blutdrucks in relativ großer Menge in das Herz gelangte.

Kaninchen II (2300 g ♀).

Die Druckhöhe beträgt vor der ersten Injektion (2 ccm) $2 \times 45 = 90$ mm, sinkt sofort nach dieser auf 58 mm herab, steigt danach im Verlaufe von 6 Minuten bis auf 64 mm, um unmittelbar nach einer zweiten Einspritzung (2 ccm) wieder sich auf 56 mm zu erniedrigen und von diesem Punkte aus innerhalb der nächsten 9 Minuten auf 70 und, nachdem seit der ersten Injektion 25 Minuten verflossen sind, wieder zur Norm zurückzukehren.

Ich tötete das Tier alsdann durch Chloroform. Sektion zeigt, daß alle Organe normal sind.

Kaninchen III (2800 g ♀).

Normale Druckhöhe 88 mm. Nach einer Injektion von 4 ccm sofortiges Herabsinken auf 78 mm, nach 2 Minuten noch einmal ein plötzlicher Abstieg (auf 66 mm) und im Anschluß daran ganz allmähliche Erniedrigung des Druckes. Nach 10 Minuten Tod, wohl wiederum durch Magnesiumsulfat bedingt.

Sektionsbefund: Keine Organveränderungen; keine Blutgerinnung; kein Eiweiß im Urin.

Kaninchen IV (2700 g ♀).

Anfangsdruckhöhe 90 mm. Sogleich nach der Injektion von 2 ccm Abfall bis 30 mm; allmähliches Aufsteigen; nach 10 Minuten 70 mm; jetzt zweite Einspritzung (2 ccm): Herabsinken auf 58 mm; neuer Anstieg auf 64 mm bis zur dritten

Injektion (2 ccm) nach insgesammt 17 Minuten. Nach dieser Abfall auf 48 mm und von da an wieder sanftes Ansteigen, so daß nach 30 Minuten, vom Beginn des Versuchs gerechnet, die Norm wieder erreicht ist.

Von einer Steigerung des Blutdrucks durch den in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Alkoholextrakt der menschlichen Placenta kann also keine Rede sein. Meine Versuchsergebnisse stehen damit auch gleich denen von Weymeersch im Gegensatz zu den Resultaten, die Dixon und Taylor gefunden haben. Ich hatte die Absicht gehabt, falls Drucksteigerung eingetreten wäre, die drucksteigernde Substanz chemisch nach Möglichkeit zu isolieren und auf ihre Ähnlichkeit mit Adrenalin zu prüfen. Diesen Plan konnte ich nun natürlich nicht ausführen.

4. Enthält die Placenta ein Hämolysin?

Nach Korschun und Morgenroth[1]) findet sich in Pankreas, Nebenniere, Milz, Magen, Darm usw. von Säugetieren ein Hämolysin, welches wasserlöslich ist und durch Kochen nicht zerstört wird. Man extrahiert es mit Alkohol oder Äther. Zusatz von Lecithin macht es besonders aktiv. Wohlgemuth[2]) fand im Pankreassaft des Menschen eine Substanz, Prolecithid, die durch Gegenwart von Lecithin zu hämolytischer Wirkung aktiviert wird, und er glaubt, daß höchstwahrscheinlich in den Drüsen von sämtlichen Säugetieren normalerweise Hämolysin gebildet wird. Freund und Mohr[3]) haben aus der Placenta ein hämolytisch wirkendes Gift in Gestalt von ölsaurem Natrium hergestellt, das von Tallqvist[4]) schon vorher aus dem Extrakt von Bothriocephalen isoliert worden war.

Ölsaures Natrium gehört zu den Seifen, die sämtlich gewisse hämolytische Wirkungen besitzen.

1. Ich setzte von einer Lösung des Alhoholätherextraktes einer Placenta in 0,9%iger Kochsalzlösung 1, 2, 3, 4, 5 ccm zu je 10 ccm einer 1%igen, mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellten Aufschwemmung von Blutkörperchen der Placenta-

[1]) Berlin. klin. Wochenschr. 1902, 870.

[2]) Diese Zeitschr. 4, 271, 1907.

[3]) l c.

[4]) Zeitschr. f. klin. Med. 61, 427, 1907.

gefäße und ließ die Proben 24 Stunden im Wärmebade stehen. Nach Verlauf dieser Zeit war keine Hämolyse eingetreten.

2. Um zu prüfen, ob vielleicht der in physiologischer Kochsalzlösung unlösliche Teil des Alkoholätherextraktes wirksam sei, schwemmte ich letzteren mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf, ohne zu filtrieren, und setzte von dieser Aufschwemmung 1, 2, 3, 4, 5 ccm zu je 10 ccm einer 10 %igen Suspension von Placentablutkörperchen. Nach 24stündiger Wärmebadeeinwirkung war nichts von Hämolyse wahrzunehmen.

3. Um mich ferner auch über den von den eingangs erwähnten Autoren[1]) besonders betonten Wert eines Lecithinzusatzes zu unterrichten, ließ ich ein Gemisch von 30 ccm obiger Aufschwemmung mit 10 ccm einer 5 %igen Methylalkohollösung von Lecithin (Kahlbaum) 24 Stunden im Wärmebade stehen, kochte es dann 1 Stunde lang auf dem Wasserbade und filtrierte es nach völligem Erkalten. 1, 2, 3, 4, 5 ccm Filtrat setzte ich zu je 10 ccm einer 1 %igen Blutkörperchensuspension und brachte die Proben ins Wärmebad. Innerhalb 24 Stunden trat keine Hämolyse ein.

Es ist mir somit weder mit dem wasserlöslichen Teil des Alkoholextraktes menschlicher Placenta noch mit dem ganzen Alkoholextrakt allein und im Verein mit Lecithin gelungen, eine hämolytische Wirkung zu erzielen. Daß ölsaures Natron in minimalen Mengen vorhanden ist, will ich nicht in Abrede stellen; aber seine Menge ist jedenfalls so gering, daß sie keine Wirkung lösender Art unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen auszuüben vermag.

Die normale menschliche Placenta enthält also weder ein Toxin noch ein Analogon des Mutterkorns oder des Adrenalins, noch endlich ein Analogon einer Saponinsubstanz, wohl aber enthält sie pharmakologisch interessante Enzyme, welche eine Reihe von Glykosiden und Estern hydrolytisch zerlegen. Eine Einwirkung auf Alkaloide scheinen diese Enzyme nur in geringem Grade zu besitzen.

---

[1]) Morgenroth und Reicher, Berlin. klin. Wochenschr. 1907, 38.

Über Lipoide.

Von

Sigmund Fränkel.

IV. Mitteilung.

Über die Phosphatide des Rinderpankreas.

Von

G. A. Pari, Padua.

(Aus dem Laboratorium der L. Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 7. März 1909.)

Gelegentlich der Untersuchung von Pferdepankreas hat im hiesigen Institut Th. R. Offer ein gesättigtes Phosphatid vom Schmelzpunkte 167° entdeckt, neben anderen gesättigten Phosphatiden, über welche noch im Gang befindliche Untersuchungen in einer der nächsten Mitteilungen dieser Serie berichtet werden wird. Als wir nun das Rinderpankreas nach analogen Methoden auf seine Phosphatide zu untersuchen begonnen haben, stellte sich die merkwürdige Tatsache heraus, daß im Rinderpankreas die von Offer gefundene Substanz nicht vorkommt. Also dasselbe Organ enthält bei verschiedenen Tieren verschiedene Phosphatide, was uns für wichtige physiologische und pathologische Funktionen dieser Substanzen zu sprechen scheint.

Bei der Untersuchung des Rinderpankreas ist es nun gelungen, ein Phosphatid zu entdecken, welches im Gegensatze zu den meisten bekannten Phosphatiden in Aceton und Methylacetat löslich ist. Auf die Fähigkeit einzelner Phosphatide, sich in Aceton oder Methylacetat zu lösen, lenkte uns schon die im hiesigen Institute gemachte Beobachtung von Bolaffio[1]), der

---

[1]) Diese Zeitschr. 9, 45, 1908.

im Acetonextrakt von Hühnereidotter in kleinen Mengen ein solches Phosphatid gefunden hat und als Cadmium-Verbindung isolieren konnte. Ebenso war es uns aus den hier im Gange befindlichen Arbeiten über Gehirnphosphatide bekannt, daß man mit Aceton aus Gehirn zwei verschiedene Phosphatide, ein gesättigtes und ein ungesättigtes, darstellen kann.

Als wir nun den Acetonextrakt des Rinderpankreas prüften, so fanden wir denselben, trotzdem das verwendete Pankreas auf das sorgfältigste mechanisch vom Fett befreit war, sehr fettreich, aber dieses Fett erwies sich als stickstoff- und phosphorhaltig. Wir konnten daher mit Aceton und mit Methylacetat, welches sich nach dieser Richtung hin als gleichwertig erwies, das Phosphatid vom Fett nicht abtrennen, und wählten dazu ein anderes, im experimentellen Teile beschriebenes Verfahren.

Es gelang uns auf diese Weise aus dem Rinderpankreas ein ungesättigtes Phosphatid in Form seiner Cadmium-Verbindung darzustellen, dessen Analysen sich für die Formel

$$C_{32}H_{63}NPO_9CdCl_2$$

berechnen lassen. Aus ca. $5^1/_2$ kg Pankreas erhielten wir 20,2 g dieser Cadmium-Verbindung. Dieses Phosphatid enthält keine Galactose,[1] gibt bei der Spaltung zwei Fettsäuren, eine gesättigte und eine ungesättigte, und man wäre geneigt, gesützt auf die Relationen $N:P:Cd:Cl_2$, diese ungesättigte Substanz als ein Lecithin anzusehen, weil es ein ungesättigtes Monoaminomonophosphatid ist. Doch stehen dieser Annahme zwei Beobachtungen entgegen. Vor allem spricht der weitaus geringere Gehalt der Substanz an Kohlenstoff gegen Lecithin, das selbst bei der Annahme eines Palmityl-Oleyl-Lecithins 42 C erfordern würde. Auch enthält die Verbindung, nach der Berechnung 9 Sauerstoffe, während Lecithin nur 8 enthält.

Außerdem erschien es uns äußerst auffällig, daß die Bestimmung der Methyle am Stickstoff in zwei parallelen Versuchen das gleiche Resultat zeitigte, daß auf je ein N-Atom vier Methylgruppen in dieser Verbindung enthalten sind, während Lecithin infolge seines Cholin-Gehaltes nur drei Methyle bei der gleichartigen Behandlung abgibt. Es ist daher die Annahme ausgeschlossen, daß das vorliegende Monoamino-

monophosphatid ein Lecithin ist, sondern es beteiligen sich an dessen Aufbau niedrigere Fettsäuren als Palmitin- oder Stearinsäure, ferner enthält diese neue Verbindung nicht Cholin sondern eine andere Base. Wie das Lecithin, so ist auch das ungesättigte Phosphatid aus dem Pankreas optisch aktiv, und die optische Aktivität dürfte auch hier auf die Glycerinphosphorsäure zurückzuführen sein, was für das Lecithin Ulpiani,[1]) Willstätter und Lüdecke[2]) bewiesen haben.

Bei der Hydrolyse dieses Phosphatids welches wir Vesalthin nennen, erhielten wir eine gesättigte Fettsäure, welche F = 54° C und sich als Myristinsäure $C_{14}H_{28}O_2$ erweist. Der relativ niedrige Kohlenstoffgehalt erklärt sich aus dem Vorkommen dieser Säure. Die Myristinsäure ist als Spaltungsprodukt von Gehirnphosphatiden von Fränkel gefunden worden. Die Formel

$$C_{32}H_{63}NPO_9 . CdCl_2$$

läßt sich daher auflösen in

$$C_{14}H_{27}O . C_{18}H_{36}NO_4 . PO_4 . CdCl_2.$$

Über die weiteren Spaltungsprodukte dieser Substanz, die ungesättigte Fettsäure, die anscheinend eine geringere Kohlenstoffzahl hat als die Ölsäure, sowie die anscheinend sehr interessante Base, welche bei der Methylbestimmung vier Methyle abspaltet, während Cholin nur drei Methyle enthält, werden wir demnächst weitere Mitteilung machen, da es uns gelungen ist, Metallverbindungen dieser Base darzustellen.

Aus dem alkoholischen Extrakt von Pankreas konnten wir mit Cadmiumchlorid eine zweite Verbindung isolieren, die wir bis jetzt nicht analysenrein dargestellt haben.. Wir sind daher vorläufig nicht imstande, eine vollständige Formel zu berechnen, und können nur darauf hinweisen, daß sich die Elemente C, H, N, Cd, Cl auf die gegenseitigen Relationen $C_7H_{15}NCdCl_2$ berechnen lassen. Phosphor ist nur in so kleinen Mengen vorhanden, daß es sich nicht in die Formel einrechnen läßt, und entstammt den kleinen Mengen fremder Asche, welche die Cadmium-Verbindung begleitete.

Wir möchten dabei bemerken, wie gefährlich es ist, sich nur auf qualitative Proben oder auf dürftige Analysen zu

---

[1]) Atti Accad. Lincei [5], 10, 368, 421.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 3753, 1904.

stützen, um über die Phosphatidnatur einer Substanz zu urteilen. Wir haben hier eine Substanz, die ganz so wie die Cadmium-Verbindungen der Lipoide aussieht, die N und P enthält, und doch keine Cadmium-Verbindung eines Lipoides ist, wie es schon der niedrige C-Gehalt beweist.

Diese Verhältnisse $C_7H_{15}N$ erinnerten uns an eine von Pröscher[1]) berechnete Substanz $C_7H_{15}NO_6$, die vom Entdecker als Formylglucosamin oder Acetylpentosamin betrachtet wurde, gestützt auf sehr dürftige Analysen eines Dimethylaminobenzaldehydderivates (Farbstoffes) der zugrunde liegenden Substanz. Die Pröschersche Substanz wurde im Harn gefunden und ist anscheinend die Ursache der Ehrlichschen Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd und Salzsäure im Harn. Wir behandelten daher unsere Substanz (nach Zerlegung der Cadmium-Verbindung mit Schwefelwasserstoff) in der vorgeschriebenen Weise mit Dimethylaminobenzaldehyd; die Reaktion fiel jedoch negativ aus. Aber die Orcinreaktion fiel positiv aus, so daß wir es jedenfalls für sehr wahrscheinlich halten, daß es sich um ein Acetylpentosamin handelt. Wir erinnern daran, daß Th. R. Offer[2]), im hiesigen Institute, aus Pferdeleber ein Dipentosamin und ein Diacetylpentosamin darstellen konnte, welche Körper möglicherweise in einer Beziehung zu der von uns dargestellten Substanz stehen könnten.

Es ist uns gelungen, diese Substanz über das Platinat zu reinigen, so daß wir Hoffnung haben, außerhalb des Rahmens der Publikationen über Lipoide über diese Substanz späterhin weiteres zu berichten, woran wir momentan durch äußere Umstände verhindert sind.

Über die biologischen Beziehungen der Phosphatide des Pankreas gedenken wir selbst weitere Untersuchungen anzustellen.

Experimenteller Teil.

Drei Portionen Rinderpankreas wurden nach gleicher Methodik behandelt und die in gleicher Art gewonnenen Extrakte vereinigt. Es wurde zuerst das Fett vom Pankreasgewebe mechanisch möglichst sorgfältig entfernt, dann wogen die drei

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 520, 1901.

[2]) Th. R. Offer, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 399, 1906.

Portionen zusammen 5630 g. Das Pankreas wurde mit der Fleischmaschine zerkleinert, und im Thermostaten bei 100° durch 2 bis 3 Stunden getrocknet. Vorherige Untersuchungen im hiesigen Institute hatten gezeigt, daß die meisten Lipoide durch dieses Erwärmen im Trockenschrank keinen Schaden erleiden. Wasser und flüssiges Fett wurden dabei so viel als möglich abgegossen. Es wurde stundenlang mit kaltem Aceton extrahiert, und dann wiederholt mit heißem Aceton in einem großen metallischen Soxhlet-Apparat, bis Aceton nichts mehr aufnahm. Das Pankreas wurde auf diese Weise nach Befreien vom Aceton im Vakuum staubtrocken und ließ sich fein pulvern. Das Organ wurde dann wiederholt mit 96°/₀igem Alkohol und zuletzt mit 70°/₀igem Alkohol ausgekocht.

Extrakt mit kaltem Aceton.

Dieser ist hellgelb. Eingeengt, wird er rotbraun, und beim Erkalten krystallisiert aus demselben Fett heraus. Die Mutterlauge, weiter eingeengt, läßt wenig von einer braunen Schmiere zurück.

Extrakt mit heißem Aceton.

Bei den ersten Extraktionen ist die acetonige Lösung stark gelb, und beim Erkalten krystallisiert sehr reichlich eine gelbe Masse, die wie Fett aussieht, und dementsprechend einen tiefen Schmelzpunkt (in den verschiedenen Portionen etwas schwankend zwischen 48° und 60°) hat und (wie es bei starker Vergrößerung zu erkennen ist) aus einem Filzwerk feinster Nadeln besteht.

Der Hauptteil dieser Masse besteht wirklich aus Fett, was auch seine Löslichkeit in den bekannten Lösungsmitteln beweist. Das nach langer Extraktion mit Petroläther im Soxhlet-Apparat gereinigte Fett ist schneeweiß, krystallinisch, enthält nur 0,0264°/₀ N, und enthält 76,93°/₀ C und 12,59°/₀ H (mittlere Zusammensetzung von Tierfett 76,5°/₀ C, 12,0°/₀ H, 11,5°/₀ O).

Die gelbe Masse jedoch entwickelt beim Erhitzen mit Natronkalk reichlich Ammoniak und gibt nach dem Verschmelzen mit Ätznatron und Salpeter, mit Ammonmolybdat starke Phosphor-Reaktion, was darauf hinweist, daß neben dem Fett auch eine N- und P-haltige Substanz vorhanden ist. Wir wollen nicht alle die zeitraubenden Versuche beschreiben, die

wir gemacht haben, die N- und P-haltige Substanz vom Fett zu trennen, wobei wir absoluten und 96%igen Äthylalkohol, Methyl- und Amylalkohol, Aceton, Methyl- und Amylacetat, Äther, Petroläther, ätherische Sublimatlösung, alkoholische Chlorcadmium-Lösung usw., vergeblich benützten. Wenn ein Niederschlag entsteht, so ist es immer mehr oder weniger Stickstoff enthaltendes Fett. Zum Ziele konnten wir nur nach folgender Methode gelangen.

Wir lösten die ganze Menge Fett in 96%igem Äthylalkohol heiß auf und ließen erkalten. Es fiel ziemlich viel Fett heraus, das nur schwache N-Reaktion gab. Wir filtrierten von diesem, und aus dem Filtrat krystallisierte wieder Fett heraus, und wir filtrierten wieder davon ab, bis im Filtrate nach 48 Stunden kein Fett mehr sich abschied. Wir gossen dann alkoholische Chlorcadmium-Lösung in Überschuß hinein, und schon nach kurzer Zeit filtrierten wir den entstandenen Niederschlag ab. Die Cadmium-Verbindung wurde nun in heißem Benzol gelöst, das Benzol so lange abdestilliert, bis es wasserfrei überging, und die Verbindung auf diese Weise entwässert war. Die klare benzolische Lösung (es war alles in Lösung gegangen) ließen wir erkalten und fällten im erkalteten Filtrat die Substanz mit absolutem Alkohol. Der Niederschlag, im Vakuum getrocknet, wog 20,2 g, und war die fettfreie Cadmium-Verbindung einer Substanz, die wir Vesalthin nennen werden.

Die alkoholische Mutterlauge gab beim Einengen nur wenig braune Schmiere, so daß nur das eine ungesättigte Phosphatid in diesem Extrakt enthalten war.

Vesalthincadmiumchlorid.

Vesalthincadmiumchlorid ist eine rosarot-gelbliche Substanz, die sich leicht pulvern läßt. Bei starker Vergrößerung sieht man, daß dieses Pulver aus unregelmäßigen Klümpchen besteht, die zwischen gekreuzten Nikols nicht leuchten. Die Substanz ist in Wasser, Äthyl- und Methylalkohol, Äther unlöslich, in Benzol und in Amylalkohol vollständig löslich.

Beim Erwärmen bräunt sie sich, langsam bei 90°, rasch bei 180° bis 190°. Bei 190° wird sie gallertartig, halbdurchsichtig. Bei 220° wird sie wieder undurchsichtig, gelb und

entwickelt Gase. Ein wirklicher Schmelzpunkt ist nicht zu beobachten.

Die Substanz wurde immer im absoluten Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und zur Konstanz gebracht, und in solchem Zustande den Analysen unterworfen.

Die Elementaranalyse ergab folgendes Resultat:

0,2325 g Substanz gaben 0,3975 g CO_2, d. i. 46,62 %
und 0,1607 g H_2O, d. i. 7,73 %
0,2036 g Substanz gaben 0,3501 g CO_2, d. i. 46,92 %
und 0,1425 g H_2O, d. i. 7,83 %

Die N-Bestimmung nach Dumas ergab:

0,3106 g Substanz gaben V 4,75, T 19,8, B 760,1, d. i. 1,78 %,
0,3279 g " " V 4,61, T 16,0, B 767,9, d. i. 1,68 %.

Die P-Bestimmung wurde durchweg nach Liebig ausgeführt und hierauf nach Woy gefällt:

0,4997 g Substanz gaben 0,0696 g $Mg_2P_2O_7$, d. i. 3,88 %,
0,4456 g " " 0,0619 g $Mg_2P_2O_7$, d. i. 3,87 %.

Die Cd-Bestimmung wurde nach der in der II. Mitteilung dieser Serie von Nogueira beschriebenen Methode ausgeführt und ergab:

0,1943 g Substanz gaben 0,0494 g $CdSO_4$, d. i. 13,71 %,
0,1714 g " " 0,0441 g $CdSO_4$, d. i. 13,87 %.

Die Cl-Bestimmung wurde gewichtsanalytisch, mit folgendem Resultate ausgeführt:

0,2502 g Substanz gaben 0,0881 g AgCl, d. i. 8,71 %.

Zusammenstellung der analytischen Resultate:

	Gefunden:		Durchschnitt:	Berechnet für $C_{32}H_{63}NPO_9CdCl_2$
C	46,62	46,92	46,76	46,85
H	7,73	7,83	7,78	7,69
N	1,78	1,68	1,73	1,71
P	3,88	3,87	3,875	3,87
Cd	13,87	13,71	13,79	13,72
Cl	8,71		8,71	8,65
			82,645	
O	aus der Differenz		17,355	17,57

Jodzahlbestimmung.

Die Jodzahlbestimmung wurde nach Hübl[1]) ausgeführt und ergab folgende Resultate:

0,3846 g Substanz nahmen so viel J auf, als es 12,5 ccm einer $^{n}/_{10}$-J-Lösung entspricht, das heißt 0,158 g. Es wurde daraus eine Jodzahl von 41,18 ermittelt.

Da die Cd-Verbindung von Vesalthin 22,37% $CdCl_2$ enthält, kommt der cadmiumfreien Substanz eine Jodzahl von 53.04 zu.

Optische Aktivität.

Die Substanz dreht rechts. Eine Lösung, die in 10 ccm Benzol 0,0285 g Substanz enthielt, zeigte im 2 cm langen Rohre eine Drehung von + 0,675, die einer spezifischen Drehung von + 118,4 entspricht. Da die Lösung nur dürftig genügendes Licht durchgehen ließ, ist diesen Zahlen nur ein approximativer Wert beizumessen. In längeren Röhren konnte die Substanz wegen der geringen Lichtdurchlässigkeit nicht polarisiert werden.

Bestimmung von Methyl am N.

Wir haben es auch unternommen, nach Herzig und Meyer[2]) die Methylgruppen am Stickstoff zu bestimmen.

0,1528 g Substanz gaben 0,1842 g JAg, d. i. 0,01175 g Methyl, oder 7,69% Methyl. — 0,1958 g Substanz gaben 0,2248 g JAg, entsprechend 0,01434 g Methyl, gleich 7,32%.

Aus dem Mittelwert der zwei Bestimmungen (7,50%) und aus dem Gehalt der Substanz an N (1,72%) ergibt sich eine Zahl von 4 Methylen am N.

	Gefunden:		Durchschnitt:	Berechnet für 4 Methyle am N:
CH_3	7,69	7,32	7,50	7,37

Alkoholischer Extrakt.

Der Extrakt zeigt eine mehr oder weniger intensive gelbe Färbung. Aus den ersten Portionen krystallisiert beim Erkalten wenig Fett. Dieses wird aus absolutem Alkohol umkrystallisiert;

---

[1]) Siehe Fränkel, Descriptive Biochemie S. 10.

[2]) Monatsh. f. Chem. 15, 613.

in der alkoholischen Mutterlauge fällt mit Cadmiumchlorid ein weißer Niederschlag heraus, der, wegen der kleinen Menge, nicht weiter verfolgt wird.

Der Extrakt wird nach der Filtration eingeengt, zuerst durch Destillation im Vakuum und dann auf dem Wasserbad. Es fällt dabei Boden zu ein wenig braune Schmiere. Der Extrakt wird dekantiert.

Der eingeengte Extrakt gibt jetzt mit Cadmiumchlorid einen voluminösen Niederschlag, der abfiltriert und im Vakuum getrocknet wird. Die filtrierte Mutterlauge, durch Destillation im Vakuum weiter eingeengt, läßt keinen Niederschlag mehr herausfallen.

Der durch Zusatz von Cadmiumchlorid entstandene Niederschlag wiegt — getrocknet und gepulvert — 14,85 g. Derselbe wird mit Benzol behandelt, Benzol wird so lange herausdestilliert bis es klar übergeht, und dann wird das Ganze filtriert. Auf dem Filter bleibt eine Substanz, die ich weiter unten besprechen werde. Aus dem Filtrat fällt mit absolutem Äthylalkohol ein flockiger Niederschlag heraus, der sich durch Filtration von der Mutterlauge trennen läßt, und im Vakuum getrocknet wird. So erhielten wir 1,58 g einer harten Substanz, die sich etwas schwer pulvern läßt und eine rötlichgelbe Farbe zeigt.

Die auf dem Filter gebliebene Substanz wird mit Alkohol, dann mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Sie ist dann graugelb und läßt sich äußerst leicht pulvern. Menge; 9,2 g.

Die Substanz ändert sich nicht merkbar beim Erwärmen, und schmilzt bei 280°. Im Mikroskop sieht man ganz kleine Körnchen, die im polarisierten Licht bei gekreuzten Nikols nicht leuchten.

Die Substanz ist in Wasser löslich, in Alkohol, in Aceton und in Benzol unlöslich.

Sie gibt mit Orcin, konzentrierter Salzsäure und Eisenchloridlösung positive Reaktion. Die grüne Farbe wird von Amylalkohol aufgenommen. Nach Verdünnung mit Äthylalkohol zeigt die Lösung den charakteristischen Streifen zwischen C und D.

Mit Phloroglucin und konz. Salzsäure trat keine, oder nur sehr schwache Reaktion auf.

Die Probe mit α-Naphthol und konzentrierter Schwefelsäure fällt negativ aus, ebenso wie die Pyrrolprobe. Die Substanz reduziert weder Fehlingsche Lösung (auch nach vorhergehendem längerem Kochen mit verdünnter Salzsäure nicht) noch das Almèn-Nylandersche Reagens.

Die Substanz war nicht ganz rein, wie aus den Analysen zu ersehen ist. Wir teilen aber hier die Analysenresultate mit, weil aus denselben einige deutliche Relationen zu ermitteln sind. Zu den Analysen war die Substanz im Trockenschrank bei 100° getrocknet.

Die Elementaranalyse ergab:

0,1998 g Substanz gaben 0,1150 g CO_2, d. i. 15,70%
und 0,0531 g H_2O, d. i. 2,97%,
0,2168 g Substanz gaben 0,1173 g CO_2, d. i. 14,76%
und 0,0516 g H_2O, d. i. 2,66%.

Die N-Bestimmung nach Dumas ergab:

0,3256 g Substanz gaben V 7,35, T 19,1, B 770,1, d. i. 2,67%,
0,3051 g „ „ V 6,76, T 20,2, B 764,8, d. i. 2,60%.

Die P-Bestimmung, nach Liebig ausgeführt und nach Woy gefällt, ergab:

0,4476 g Substanz gaben 0,0196 g $Mg_2P_2O_7$, d. i. 1,22%,
0,4879 g „ „ 0,0201 g $Mg_2P_2O_7$, d. i. 1,15%.

Die Cd-Bestimmung ergab:

0,2233 g Substanz gaben 0,0884 $CdSO_4$, d. i. 21,34%.

Die Cl-Bestimmung wurde in der wässerigen Lösung titrimetrisch nach Mohr ausgeführt, 0,1957 g Substanz verbrauchten 4,45 ccm einer Silbernitratlösung von der 1 ccm 1 g ClNa entspricht, d. i. 13,79%. Schwefel ist nicht vorhanden.

Der geringe P-Gehalt, der sich nicht rechnen läßt, beweist, daß die Substanz nicht rein ist und wahrscheinlich Asche enthält, so daß eine Formel nicht zu rechnen ist. Aus den Verhältnissen $C_{6,63}H_{15,00}N_{1,00}Cd_{1,00}Cl_{2,07}$ sind doch die Relationen $C_7H_{15}NCdCl_2$ zu ermitteln.

70%iger Alkoholextrakt.

Vom 70%igen Alkoholextrakt ist nicht viel zu bemerken. Der nach Einengung mit Cadmiumchlorid erhaltene Niederschlag besteht, wenigstens der Hauptmasse nach, aus Eiweiß und gibt Biuretreaktion.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

11. Mitteilung.[1])

Untersuchungen über die Funktion der Milz.

Von

Hans Großenbacher.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 17. Februar 1909.)

Mit 6 Figuren im Text und 1 Tafel.

Inhaltsangabe.

Einleitung.

Die Milz war von alters her Gegenstand von Untersuchungen mannigfachster Art; der Drang nach Verständnis machte auch hier nicht halt; die Schranken erschienen nicht unübersteigbar, waren doch scheinbar viel schwierigere Rätsel unseres Organismus gelöst worden. Forderte doch die Größe dieses Organs direkt zum Nachforschen heraus. Es konnte doch vielleicht eine seinem Volumen entsprechende lebenswichtige Funktion besitzen; sollte diese unauffindbar sein? Man hatte ja schon

[1]) Die 10. Mitteilung erschien in der Zeitschr. f. Biol. 51.

viel verborgener scheinende Funktionen viel kleinerer Organe aufgedeckt.

Sicherlich hat es an den nötigen Anstrengungen nie gefehlt; die Zahl der unternommenen Forschungen ist ungemein groß und es reichen deren Anfänge auf die alten Griechen zurück. Wohl nirgends aber sind diese Unternehmungen mit solchem Undank gelohnt worden wie bei diesem Falle; glaubte man endlich etwas Positives gefunden zu haben, so erwies sich dieses Etwas nur allzubald als Irrtum oder nicht streng beweisbar; es ist tatsächlich bis auf den heutigen Tag nicht gelungen, auch nur einigermaßen genügendes Licht in dieses Dunkel zu bringen, die Milz ist noch heute eine „terra incognita"; wir sind betreffs Kenntnis ihrer physiologischen Tätigkeit nicht viel weiter als vor 50 Jahren.

Woran es liege, daß die unternommenen Experimente so wenig Positives zutage gefördert haben, wird verschieden argumentiert. So wird geltend gemacht, daß die Milz, wie die anderen Drüsen mit innerer Sekretion, keinen Ausführungsgang besitze und es deshalb schwer halte, die Art und Wirkungsweise ihrer offenbar sehr differenten Produkte festzustellen; ferner sei es unmöglich, irgend einen sichern Schluß betreffs ihrer Aufgabe im Organismus zu tun, solange nach ihrer operativen Entfernung keine Veränderungen und Störungen in der Lebensweise des betreffenden Individuums auftreten.

Es seien das wenige, was man über sie weiß, das Interessanteste von dem, was man im Laufe der Zeit über sie spekuliert und ihr zugeschrieben hat, und die Ergebnisse der wichtigsten Untersuchungen, die hätten bahnbrechend wirken sollen, kurz erwähnt, soweit es wenigstens in den Rahmen dieser Arbeit paßt; so kann beispielsweise weder auf die Schiffsche Ladungstheorie noch auf die Miescherschen Befunde und ihre Schlußfolgerungen, so viel Interessantes sie auch bieten, näher eingetreten werden, ich werde mich, wie auch vielfach bei den Exstirpationsversuchen, auf die bloße Namensnennung der betreffenden Autoren und Operateure beschränken.

Die Milz kommt bei allen Wirbeltieren mit Ausnahme des Amphioxus und einiger Myxinoiden vor. So verschieden dieselbe bei verschiedenen Wirbeltieren sich auch hinsichtlich ihrer Größe gestaltet, so gleichmäßig ist sie doch betreffs ihres ver-

wickelten Baues bei allen. Dieses regelmäßige Vorkommen scheint an und für sich schon für die Bedeutung dieser Drüse im Organismus zu sprechen. Sie wird ihrem Bau nach zu den sog. Blutlymphdrüsen gezählt, mit denen sie das Fehlen eines Ausführungsgangs gemein hat; auch funktionell soll sie nach vielen, namentlich älteren Verfassern, viel Ähnlichkeit mit denselben besitzen, indem sie sich mehr oder weniger direkt an der Blutbildung beteilige. So berichtet Gruenhagen in seinem Lehrbuch der Physiologie:

„Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß unter dem in verschiedenen Formen in ihr verbreiteten cythogenen oder adenoiden Zellgewebe zahlreiche, meist den Lymphkörperchen oder farblosen Blutkörperchen identische Zellen gebildet und dem sie durchströmenden Blute einverleibt werden. Sie ist demnach wie die Lymphdrüsen eine Brutstätte für die Formelemente des Blutes und unterscheidet sich von jenen nur durch den unmittelbaren Verkehr der Bildungsherde dieser Formelemente mit den Blutbahnen.“ Diese Definition gründet sich vornehmlich auf die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der Milzstruktur.

Koelliker und Funke konstatierten ebenfalls einen außerordentlichen Reichtum des Milzvenenblutes an farblosen Zellen.

Tellyesnicky bestätigte in neuerer Zeit durch seine histologischen Untersuchungen an der Rindermilz diesen alten Befund; er fand, daß, während bei Arteriendurchschnitten nur 1 bis 2 Leukocyten zu sehen seien, die viel breiteren Venen mit solchen prall gefüllt seien.

Übergangsstufen, welche Funke mit Bestimmtheit im Milzvenenblute beobachtet haben will, kommen nach Gruenhagen bei Erwachsenen nicht vor.

So viel scheint indessen sicher zu sein, daß die Milz während einer bestimmten Zeit des embryonalen Lebens als blutbildende Drüse die größte Rolle spielt; die außerordentliche Größe dieses Organs bei Foeten und neugeborenen Tieren scheint diese Annahme zu bestätigen. Es sollen sich auch bei jungen Tieren noch in der Milzpulpa kleine kernhaltige gelbliche Zellen von einer solchen Färbung finden, daß sie von Blutzellen kaum mehr unterschieden werden können und un-

bedingt für sich entwickelnde Blutzellen zu halten seien. Diese Funktion soll sie nach Bizzozero bei Fröschen und geschwänzten Amphibien dauernd behalten, während diese Fähigkeit bei den amnioten Wirbeltieren mehr zurücktrete.

Bei den Säugern widersprechen sich die Angaben in neuerer Zeit.

Ehrlich und Foà wollen rote Blutkörperchen bei Kaninchen und Ratten gefunden haben. Beim Menschen wird das normale Vorkommen geleugnet; die blutbildende Funktion scheint aber nach vielen übereinstimmenden Angaben bei den Säugern durch Blutentziehungen, Blutkörperchenzerstörung oder durch partielle Milzexstirpation wieder geweckt zu werden. Gestützt auf Blutkörperchenzählungen schließen Bottazzi und Gabbi auf eine hämatolytische Tätigkeit der Milz. Seemann bemerkt aber zu dieser Untersuchungsweise, daß durch Blutkörperchenzählung in dieser Hinsicht nichts zu gewinnen sei, indem neben der hämatopoetischen Funktion auch noch eine hämolytische (blutzerstörende) zu berücksichtigen sei, und daß nach den allerdings anfangs auftretenden Veränderungen in einiger Zeit sich das Blut auf seinen normalen Stand einstelle.

Nach den Untersuchungen von Paton, Gulland und Fowler soll die Milz so gut wie keinen Einfluß auf die Blutbildung ausüben; größere Blutverluste oder Blutzerstörungen sollen von milzlosen Tieren ebenso schnell repariert werden wie von normalen; Kurloff dehnt diese Behauptung auch auf die Leukocyten aus; nach seinen Experimenten spielt dieses Organ bei der Bildung der weißen Blutkörperchen eine unbedeutende Rolle.

Mit diesen wenigen Beispielen erscheint die Verworrenheit und der Widerspruch in den Ansichten über die Milz als ein Organ der Blutbildung genügend dargetan. Es ist ihr also auch diese, von den älteren Autoren als sicher angenommene Funktion neuerdings von vielen wieder abgesprochen worden.

Was die Betätigung der Milz an der Blutzerstörung, Hämolyse, betrifft, so harrt auch diese Frage noch einer Lösung; auch hier stimmen die Angaben nicht überein, obschon in diesem Falle eher eine Aussicht auf Einigung vorhanden zu sein scheint als im vorigen.

Die Milz ist ein verhältnismäßig sehr eisenreiches Organ, wie die Analysen von Auscher, Lapicque und Nasse gezeigt haben.

Nasse wies nach, daß der Eisengehalt von Milzen alter Pferde bis zu 5 °/₀ des Trockenrückstandes betragen kann. Sogar im mikroskopischen Bilde wird dieses Eisen nachweisbar, die kleinen Eisenaggregate sind gemeinhin unter dem Namen „Eisenschollen" dem Histologen bekannt. Seemann hat sich die Provenienz dieses Eisens wie folgt zu erklären versucht:

„Es besteht die Möglichkeit, daß die Zerstörung des Blutfarbstoffes bis zum Bilirubin sich schon in der Norm nicht allein in der Leber abspielt, sondern, daß ihr unfertige, aber in der Regel größtenteils eisenfreie Bruchstücke des Hämoglobinmoleküls zugeführt werden, während die Eisenkomponente an andern Stellen, nämlich in der Milz und den für sie eintretenden Organen, zurückgehalten wird."

Tellyesnicky aber leitet diesen Eisengehalt nicht vom Zugrundegehen der roten Blutkörperchen her, sondern macht darauf aufmerksam, daß derselbe auf die normalerweise in großen Mengen in der Pulpa vorhandenen Blutkörperchen zurückzuführen sei.

Auch hier gehen mithin die Ansichten einstweilen auseinander.

Nach einigen Autoren, wie Schoenfeld, Pochon und Gachet sollte die Milz ferner Beziehungen zur Verdauung besitzen, was ja Schiff schon in seiner Ladungstheorie behauptet hatte. Die Versuche hierüber sind aber so wenig abgeklärt, daß an diesem Orte nicht weiter auf sie eingetreten werden kann; es sei aber doch bemerkt, daß man dieser Seite in neuerer Zeit vermehrte Beobachtung geschenkt hat und daß es nicht ausgeschlossen ist, daß die seinerzeit ziemlich mißachteten Schiffschen Theorien in kürzerer oder längerer Zeit eine Auferstehung feiern werden, wenn auch ihre Form eine vielleicht etwas andere sein wird.

Im Anschluß an dieses wenige betreffs Milzfunktion seien auch noch die Mittel und Wege erwähnt, mit deren Hilfe man zum Ziel zu gelangen hoffte; dabei kam besonders ein Verfahren zur Anwendung: die Exstirpation. Da es unmöglich ist, durch Anlage einer Fistel die Produkte dieser Drüse zu prüfen

und auch eine medikamentöse Beeinflussung von irgendwelcher Seite her meines Wissens erfolglos war, so blieb nur dieser eine Weg offen; man hoffte durch den dadurch bewirkten Wegfall gewisser Funktionen auf diese selbst schließen zu können; zudem bot dieser operative Eingriff keine besonderen Schwierigkeiten. Von den zahlreich vorgenommenen Exstirpationen seien die markantesten kurz erwähnt, samt ihren Resultaten.

Entmilzungsversuche sind, wie bereits bemerkt, sehr alt. Schon Plinius war bekannt, daß Hunde eine Milzexstirpation überleben können, dieselbe mithin nicht lebensgefährlich sei. Man erzählt sogar, daß man ehemals den Läufern die Milz ausschnitt, um ihnen die Unannehmlichkeit der Milzstiche bei schneller Bewegung nach genossener Mahlzeit zu ersparen!

Allerdings hat man erst in der Neuzeit mit Hilfe der Asepsis und Antisepsis begonnen, Exstirpationsversuche erfolgreich und systematisch durchzuführen. In Bunges Lehrbuch der Physiologie sind die bis jetzt unternommenen Entmilzungen in umfassender Weise zusammengestellt; ich verweise daher direkt auf dasselbe. Hier seien nur die einschlägigen herausgegriffen, und zwar folgen zunächst diejenigen, die sich auf die Beobachtung von eventuell nachher auftretenden Veränderungen bezogen:

Guido Tizzoni exstirpierte jungen und alten Kaninchen die Milz; er beobachtete keine Störungen.

A. Dastre unternahm das gleiche bei jungen Hunden, Katzen, Ratten und Meerschweinchen und verglich ihre Wachstumsgeschwindigkeit mit dem normalen Tier aus dem gleichen Wurf; er fand keinen Unterschied. Die Beobachtung dauerte leider nur kurze Zeit, bei den Katzen höchstens 4 Monate. Wie sich diese beiden Versuchsserien mehr auf die Wachstumsbeobachtung beschränkten, so verfolgten andere den Zweck, die Blutbildung nach der Exstirpation zu überwachen; es seien, da die meisten schon andernorts angeführt, nur noch zwei Beobachter erwähnt: Vulpius und Emelianow.

Emelianow sah, daß nach der Entmilzung die Zahl der roten Blutkörperchen sinke, die Zahl der weißen dagegen steige.

Vulpius berichtigte diese Befunde durch Experimente an Ziegen und Kaninchen dahin, daß die Verminderung der roten

Blutkörperchen höchstens 20 % betrage und sich innerhalb eines Monats wieder völlig ausgleiche; die weißen sollen im gleichen Verhältnis zunehmen, diese Mehrproduktion gleiche sich aber auch hier sehr rasch aus.

Eine andere Änderung im Verhalten der betreffenden Tiere will Schindler gesehen haben, indem das Versuchstier eine größere Gefräßigkeit und einen häufigeren Urinabsatz zeigte; mit dieser Beobachtung dürfte er allerdings allein dastehen; bei meinen Versuchen konnte ich, um es gleich hier zu bemerken, nichts derartiges wahrnehmen.

Die Ansicht Gruenhagens, daß die Exstirpation der Milz ohne eine merkliche Störung im Befinden des betreffenden Individuums ertragen werden könne, scheint sich demnach zu bestätigen und es kann dieselbe selbst auf den Menschen Anwendung finden.

Bunge hat eine Tabelle der bis auf die heutige Zeit bekannten Milzexstirpation und ihrem Ausgange beim Menschen zusammengestellt, woraus sich ergab, daß in 69,5 % der Fälle die Operation glücklich überstanden und der Patient geheilt entlassen wurde; der Prozentsatz würde sich wahrscheinlich noch höher stellen, wenn es nicht so schwer fiele, zu entscheiden, ob die gestorbenen Patienten an dem Verluste der Milzfunktion umgekommen sind oder an den Folgen des operativ behandelten Leidens.

Angesichts dieser negativen Befunde kam man ganz von selbst auf den Gedanken einer etwaigen Kompensation der Milzfunktion durch die vikariierende Tätigkeit anderer Organe und richtete dabei sein Hauptaugenmerk auf die anatomisch verwandten Lymphdrüsen und weiterhin auf das Knochenmark.

Ältere Beobachter wollten nach der Exstirpation der Milz eine Volumzunahme der mesenterialen Lymphdrüsen wahrgenommen haben. Dazu bemerkte aber schon damals Mosler, daß die vikariierende Schwellung dieser Drüsen auftreten könne, aber keineswegs die Regel sei.

In neuerer Zeit traten Paton, Fowler und Kurloff wieder für die kompensierende Tätigkeit dieser Drüsen ein, finden aber in Laudenbach einen Gegner; derselbe konnte weder an der Thymus noch an den Lymphdrüsen irgendwelche Veränderungen bemerken.

Durch die gewissenhaften Experimente des englischen Forscher Swale Vincent scheint dieser Streit schließlich doch seine endgültige Erledigung gefunden zu haben. Dieser Forscher exstirpierte bei fünf verschieden alten Hunden die Milz; er konnte daraufhin in keinem der Fälle irgendwelche Veränderungen sowohl in der Zahl als in der Lage der Blutlymphdrüsen nachweisen, noch sollen dieselben stärker infiltriert gewesen sein.

Schon Gruenhagen hatte seinerzeit darauf hingewiesen, daß ein anderes lymphatisches Organ, das Knochenmark, nach der Entmilzung eine auffallende Steigerung seiner Lymphzellen bereitenden Funktion zeige. Da man das Knochenmark heutzutage widerspruchslos als ein blutbildendes Organ betrachtet, so liegt natürlich sehr nahe, ihm eine kompensierende Eigenschaft zuzuschreiben. Insofern man eine blutbildende Funktion der Milz annimmt, ist ein Einspringen des Knochenmarkes nach Exstirpation der ersteren denkbar. Neuere Forschungen haben wirklich eine vermehrte Fähigkeit nachgewiesen, die sich namentlich durch eine höhere Rötung manifestiere; in diesem Falle könnte man insofern einen Rückschluß auf die Milz tun, als man ihr eine hämatopoetische Rolle zuschriebe, gestützt auf die nach ihrer Entfernung gesteigerte Tätigkeit des Knochenmarkes.

Die Ungewißheit und die Unentschiedenheit in den Ansichten über die Physiologie der Milz rief, wie immer in solchen Fällen, viele bloße Vermutungen und Hypothesen, die heute zum Teil widerlegt sind, zum Teil sich mangels gegenteiliger Beweise immer noch halten können, hervor.

So sind die Schiffschen Theorien die Interessantesten aus diesem Gebiete.

Bunge spricht sogar die Vermutung aus, daß die Milz in gewissen Beziehungen zur Geschlechtsfunktion stehen könne; er argumentiert, daß die Milzfunktion, wenn sie nicht zur Erhaltung des Lebens diene, so doch eventuell der Erhaltung der Art dienen könne. Die Miescherschen Untersuchungen am Rheinlachs, auf die ich nicht näher eingehe, bieten dieser Anschauung eine gewisse Stütze.

Es wurde auch die Frage aufgeworfen, ob dieses Organ nicht unter abnormen Bedingungen erst eine Bedeutung er-

langen könne, als Schutzorgan gegen gewisse Toxine und Infektionskeime usw. Bis jetzt ist diese Frage so gut wie unbeantwortet geblieben.

Vorliegende Untersuchungen hatten in der Hauptsache zwei Fragen zu beantworten, die übrigens so ziemlich unabhängig voneinander waren.

Die eine stützte sich auf eine längst bekannte Erscheinung: die außerordentliche Größe der Milz bei jungen Tieren; es lag danach sehr nahe, die Milz auf eine eventuelle Beeinflussung des Wachstums hin zu prüfen.

Ihr Volumen und die auf eine starke Drüsentätigkeit hinweisende Turgescenz ließen die Wahrscheinlichkeit einer Betätigung am Wachstumsprozeß, trotz einiger schon gemachten negativen Erfahrungen als nicht ausgeschlossen erscheinen; mochten die Veränderungen auch noch so gering sein, ich hoffte ihnen durch eine möglichst gewissenhafte Beobachtung auf die Spur zu kommen.

Die andere Frage fußte auf der eigenartigen Tatsache, daß die Milz einen relativ hohen Eisengehalt aufweist. Herr Prof. Asher machte mich darauf aufmerksam, daß die Milz demnach eine Rolle im Eisenstoffwechsel des Organismus spielen könnte; eine Teilnahme daran sei absolut nicht ausgeschlossen, da in dieser Richtung noch gar keine Untersuchungen vorlägen; es könnten beide Fragen miteinander ohne größere Schwierigkeiten und an denselben Versuchstieren untersucht werden.

In der Folge zeigten sich in der Tat keine diesbezüglichen Störungen; zwei in ihrer Art vollkommen verschiedene Untersuchungen wurden parallel nebeneinander durchgeführt, von deren erster anschließend die Beschreibung folgt.

I. Teil.

Über den Einfluß der Milz auf das Wachstum.

Wie bereits in der Einleitung bemerkt, wurden Versuche nach dieser Richtung schon von Guido Tizzoni und Dastre an verschiedenen Tieren gemacht. Es bestand aber angesichts der negativen Resultate die Möglichkeit, daß diese veranlaßt

wurden durch eine zu spät erfolgte Entmilzung und durch eine daraufhin zu kurze Zeit dauernde Beobachtung, so daß eventuelle Unterschiede überhaupt nicht mehr auftraten oder erst ganz spät erschienen und dann der Beobachtung entgingen. Dastre machte selbst auf diese Möglichkeit aufmerksam; seine längste Beobachtungszeit erstreckte sich auf höchstens 4 Monate bei der Katze. Er hatte allerdings auch Hunde zu seinen Experimenten herbeigezogen, aber es war denkbar, daß an dem einzelnen Tiere neben den vielen andern gleichzeitig untersuchten Tieren kleine Veränderungen, die sich nur durch eine auf dieses allein zu konzentrierende Aufsicht entdecken ließen, dabei übersehen wurden. Ferner waren die meisten Versuche an an und für sich kleinen Tieren, wie Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen, vorgenommen worden, wobei begreiflicherweise die Schwierigkeiten der Wachstumsbeaufsichtigung mit der natürlichen Kleinheit der zu untersuchenden Tierspezies wachsen.

Zu vorliegenden Versuchen wurden deshalb Hunde gewählt, deren Abstammung ein rasches und an der jeweiligen Körpergröße gut abzuschätzendes Wachstum garantierte. Die Tiere mußten ferner möglichst früh operiert werden, d. h. so früh, daß ihre Jugend und Konstitution das gute Gelingen des Experimentes nicht allzusehr in Fragen stellten. Die Beobachtung hatte sich auf eine möglichst lange Zeitdauer zu erstrecken und möglichst viele Punkte zu umfassen.

Versuchstiere.

Im ganzen wurden vier Tiere zu den Untersuchungen benutzt und zwar in zwei Serien zu zwei Stück. Die Welpen stammten aus zwei verschiedenen Würfen.

Serie I waren ihrer Abstammung nach deutsche Vorstehhunde. Ihre Mutter, ein preisgekröntes Tier, wurde vom betreffenden Besitzer in dankenswerter Weise dem Untersuchenden für die Dauer der Säugeperiode überlassen.

Serie II waren gemeinerer Abkunft, höchstwahrscheinlich Produkte einer Kreuzung zwischen Dachshund und schwarzem Spitzer. Dieselben kamen erst einige Tage später zu den erstern und wurden auch erst einige Tage nachher operiert.

Serie I kam mit 9 Tagen Alter zur Beobachtung,
Serie II mit 23 Tagen.

Beide Würfe wurden von der Vorstehhündin aufgezogen, dieselbe kam ihren Pflichten auch gegenüber ihren zwei Stiefkindern in aufopfernder und rührender Weise nach, so daß die Säugezeit einen völlig normalen Verlauf nahm; nach Ablauf derselben wurde sie ihrem früheren Besitzer zugestellt. Bei den beiden Serien wurde der eine Welpe zum Versuchstier, der andere zum Kontrolltier bestimmt.

Die Operation.

Um Wiederholungen möglichst zu vermeiden, seien die beiden einzelnen Operationen hier gemeinsam beschrieben; sie erfolgten beide übrigens nach dem gleichen Schema.

In jedem der Fälle wurde ohne spezielle Erwägungen eines der Tiere sofort nach ihrer Ankunft zur Exstirpation bestimmt, hierauf gemeinsam mit dem Kontrolltier und der Mutter resp. Pflegemutter photographiert und einzeln gewogen.

Andern Tags wurde die Operation vorgenommen; das Tierchen (dasjenige der Serie I war noch blind, also nicht über 9 Tage alt) war 4 Stunden zuvor von seiner Mutter weggenommen worden. Durch eine subcutane Injektion von 1 cg Morphium wurde es in Narkose versetzt (eine Chloroformnarkose schien bei diesem jugendlichen Alter und bei der ohnehin beobachteten Empfindlichkeit des Hundes gegenüber diesem Anaestheticum nicht angezeigt). Die Narkose ließ allerdings zu wünschen übrig, das Tierchen drängte während der Operation; beim Versuchstier der Serie II wurde daher die subcutane Morphiumapplikation noch durch Chloroformäther ergänzt, ohne wahrnehmbaren Nachteil; das lästige Drängen unterblieb.

Nachdem die Operationsstelle nach den operationstechnischen Vorschriften behandelt, Instrumente und Utensilien sterilisiert waren, wurde in der Linea alba vom Processus xyphoideus weg ein 4 cm langer Hautschnitt angelegt, hierauf die Bauchdecke sorgfältig durchschnitten und das Peritoneum soweit nötig getrennt.

Der Magen trat mit der ihn zum größten Teil bedeckenden Milz unter der kräftigen Wirkung der Bauchpresse spontan hervor, und es wurde ohne weiteres mit der doppelten Unterbindung der zuführenden Gefäße begonnen; nachdem dies beendigt

war, wurde der Zusammenhang mit Magen und Mesenterium mittels Messer und Finger sorgfältig gelöst, und nach erfolgter Loslösung das auffallend große und blutreiche Organ gemessen. (Die Maße werden gehörigenorts angegeben.) Nach vollzogener Exstirpation wurden die prolabierten Eingeweide nach vorausgegangener gründlicher Abspülung reponiert, die außerordentlich dünne und zarte Bauchmuskulatur durch eine zweckentsprechende Naht geschlossen und hierauf die Hautnaht angelegt. Die Wunde wurde mit Airolpaste verstrichen und das Tierchen seiner Mutter zurückgegeben, die natürlich nicht säumte, den Überzug sofort abzulecken. Die Wunde heilte unter konstantem Belecken seitens der Alten im zweiten Falle per primam, im ersten unter geringfügiger Eiterung ohne weitere Folgen. Die Nähte wurden jeweilen am zehnten Tage nach dem Eingriff entfernt. Die sofort nach der Operation einsetzenden Temperaturmessungen zeigten nichts Abnormes im Verlaufe der Wundheilung.

Zur Operation des Versuchstieres der Serie II mag noch beigefügt werden, daß mit der Milz auch ein Teil des großen Netzes samt der darin suspendierten sogenannten Nebenmilz entfernt wurde, um eine behauptete Kompensation und Regeneration der Milz durch diese winzige 2 mm im Durchschnitt messende Lymphdrüse auszuschalten. Die Operation verlief sonst in durchaus analoger Weise. Die Heilung ließ auch hier nichts zu wünschen übrig; es zeigte sich weder in diesem noch im ersten Falle irgend etwas, das als Folge des operativen Eingriffs hätte betrachtet werden können.

Haltung und Pflege.

Die Versuchstiere wurden in einer geräumigen und hellen Boxe gehalten, und zwar beide Versuchspaare in der gleichen. Der Hündin wurde eine kräftige Nahrung, bestehend aus gekochter Milch, Weizen- und Maismehl, verabfolgt, um sie in Stand zu setzen, die Jungen ausreichend ernähren zu können. Außerdem sorgte ein Wärter für sorgfältige Reinhaltung der Boxe und hatte ihm auffallende Veränderungen sofort zu melden, er hatte auch jedesmal bei der Wägung und täglichen Befundaufnahme zugegen zu sein. Nachdem die Tierchen ausgesäugt waren, nahmen sie das bishin der Alten verabreichte

Futter ohne weiteres an; dieser Übergang hatte keinen wesentlichen Unterbruch im Wachstum zur Folge.

Beobachtungsmodus.

Täglich um die gleiche Zeit, gewöhnlich um 10 Uhr morgens wurde an jedem Tier einzeln die Wägung vorgenommen, worauf eine allgemeine Inspektion (Inspektion der Schleimhäute und Prüfung des Sensoriums) folgte. Während den ersten 14 Tagen wurde morgens und abends die Rectaltemperatur bestimmt, um eine allfällige Wundinfektion rasch zu erkennen. Freßlust, Verdauung, Exkremente und Benehmen wurden im Verlaufe des Tages kontrolliert.

Die Wägungen wurden während den ersten 2 Monaten täglich, im dritten wöchentlich, im vierten alle 10 Tage durchgeführt. Die übrigen Prüfungen erfolgten wenn immer möglich täglich.

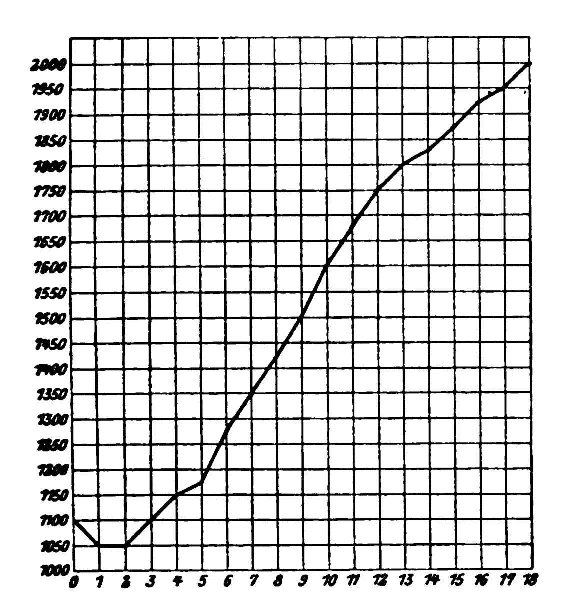
Die Versuchstiere wurden nebstdem im Anfang serienweise alle 8 Tage photographiert, eine Auswahl dieser Abbildungen findet sich der Arbeit beigefügt.

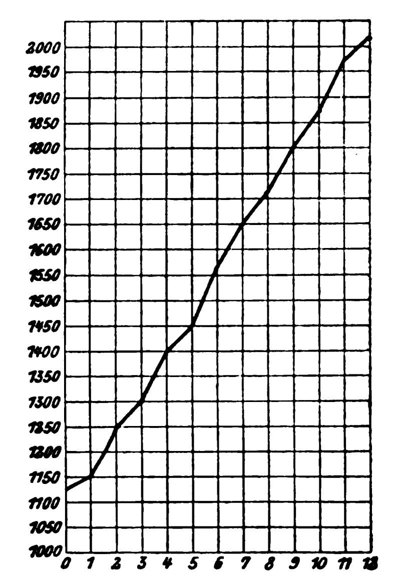
Beobachtungsergebnisse.

Zur Demonstration des Wachstumsprozesses erscheinen die Wägungen weitaus am besten geeignet; Größen- und Umfangsmessungen waren demgegenüber viel umständlicher und zeitraubender und wurden deshalb unterlassen.

Was die Prüfungen des Status praesens betrifft, so seien dieselben gleich vorweg genommen und summarisch behandelt. Sie ergaben, um es gleich von vornherein zu bemerken, keine Resultate, die als Abweichungen vom Normalzustande hätten gedeutet werden können; die betreffenden Untersuchungen waren aber nichts destoweniger gewissenhaft fortgesetzt worden. Kleine Schwankungen traten schon auf, sie können aber ganz gut auf Rechnung der Individualitätsdifferenzen gesetzt werden. So glaubte ich beispielsweise verschiedentlich bei dem entmilzten Tiere von Serie I eine gewisse Blässe der Konjunktival-, Nasen- und Mundschleimhaut gegenüber dem Kontrolltier erkennen zu können; so was konnte aber ganz gut durch die weiße Farbe des Tieres vorgetäuscht werden, das Kontrolltier war nämlich braun pigmentiert; ich glaubte vollends an eine Selbsttäuschung,

als ich trotz verschärfter Beobachtung an der andern Versuchsserie nichts finden konnte, was einen solchen Befund hätte wahrscheinlicher gestalten können.





Kurven 1 u. 2.

Die Temperaturschwankungen waren ebenfalls nicht derart, daß aus ihnen irgend ein Schluß hätte gezogen werden können; ich glaube daher auf eine Angabe der Kurve verzichten zu können. Bei dieser Gelegenheit sei ein Umstand erwähnt, der mit den bis jetzt als Norm angenommenen Angaben nicht ganz übereinstimmt.

Die Durchschnittstemperatur junger Hunde wird auf 39,5° C angegeben, bei meinen Messungen ergab sich bei allen vier Versuchstieren und bei Anwendung verschiedener Thermometer als Mittel 37,5° C; die Schwankung bewegte sich innerhalb 36,8 bis 38,5° C.

Versuchsserie I.

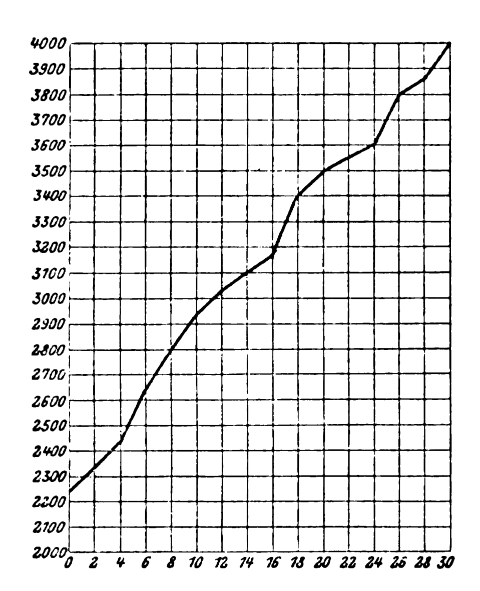
Junge I = entmilztes Tier,
" II = Kontrolltier.

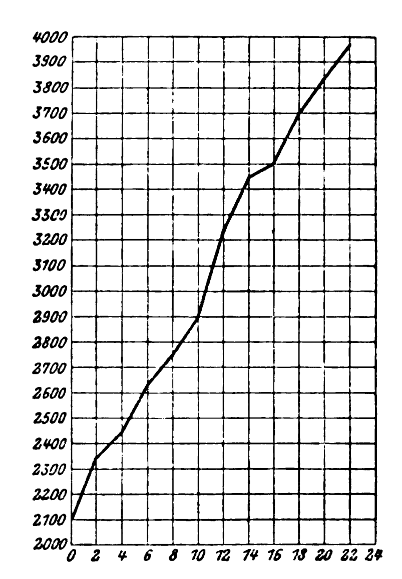
Das Alter der beiden bei Beginn der Untersuchungen war 10 Tage.

Gewicht vor der Operation: Junge I 1100 g, Junge II 1150 g,
„ nach „ „ I 1050 g, „ II —

Maße der exstirpierten Milz:

Länge	8,3 cm
Größte Breite . . .	3,5 „
Kleinste Breite . .	2,7 „
Gr. Dickendurchm. .	0,9 „





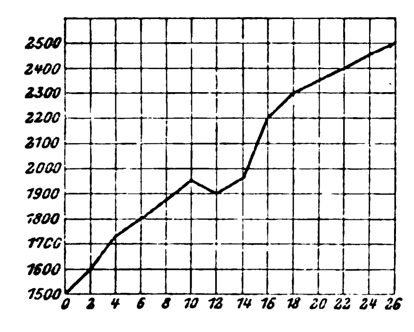
Kurven 3 u. 4.

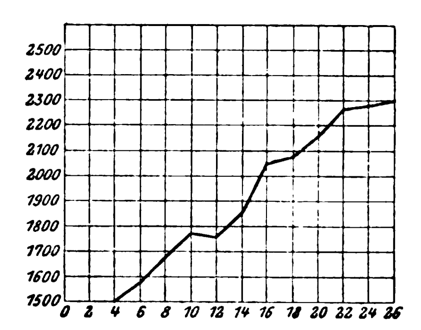
Die Länge des Tieres (Schwanz ungerechnet) 22 cm. Das Wachstum der ersten Tage sei an Hand der täglichen Wägungsergebnisse durch die graphische Darstellung veranschaulicht.

In diesen beiden ersten Kurven wurden die täglichen Wägungsergebnisse verwendet, dementsprechend wurde an der Gewichtskomponente eine Steigerung der einzelnen Posten um 50 g angenommen.

Die beiden Kurven zeigen in ihrem Verlauf eine ziemliche Übereinstimmung und gehen einander völlig parallel. Der ab-

steigende Teil im Anfange der Kurve 1 rührt von der am ersten Tage durchgeführten Operation her. Die übrigen höchst geringfügigen Abweichungen sind individueller Natur.





Kurven 5 u. 6.

Da es, wollte man der Genauigkeit keinen Abbruch tun, nicht anging, die ganze Beobachtungsperiode in einer Kurve zu skizzieren, mußten bestimmte Zeitabschnitte herausgegriffen und durch Kurven veranschaulicht werden. Wie vom Anfange, so wurde auch vom Ende der exakten Wägungsperiode eine solche entworfen, nur betrug in diesem Falle die Wägungszwischenzeit nicht mehr einen, sondern zwei Tage und dementsprechend die Differenz zwischen den Posten der andern Komponente nicht mehr 50, sondern 100 g. So war es möglich, einen größeren Zeitabschnitt übersehen zu können, ohne daß dadurch die kleinen Schwankungen in der Kurve wesentlich an Schärfe Einbuße erlitten.

Versuchserie II.

Um dem Einwand, es könnte sich bei vorliegenden Resultaten um rein zufällige oder individuelle Resultate handeln, begegnen zu können, wurden die Versuche in analoger Weise an einem zweiten Paare junger Hunde durchgeführt. Die beiden Tiere kamen drei Wochen alt zur Beobachtung. Sie wurden wie die der ersten Serie vor der Operation des einen gewogen und photographiert. Das zu entmilzende Tier war

von schwarzer Farbe, das Kontrolltier weiß. Die Exstirpation verlief auch hier glatt.

Es ergaben sich folgende Milzdimensionen:

Länge	7,8 cm
Größte Breite . . .	3,0 „
Kleinste Breite . .	2,0 „
Gr. Dickendurchm. .	0,8 „

Die Länge des Tierchens (Schwanz uneingerechnet) 25 cm.

Beobachtungsmodus, Haltung und Pflege blieben sich gleich. Da es sich hier lediglich um eine Bestätigung der ersten Befunde handelte, fasse ich die Wägungsresultate bloß in einer Kurve zusammen, aus der ungefähren Mitte der Beobachtungszeit stammend. Im übrigen ist sie gleich gehalten wie Kurve 3.

Zu den Kurven 5 und 6 ist weiter nichts zu bemerken. Sie verlaufen sozusagen synchron, wenn ich diesen Ausdruck anwenden darf. Die Kurvenverschiebung nach rechts kommt von dem kleinern Gewicht des Jungen II beim Einsetzen der graphischen Darstellung her; Junge II erreichte am vierten Tabellentage das Gewicht des Jungen I vom ersten Tage. Die beidseitig leicht erkenntlichen Schwankungen, die gleichzeitig einsetzen, finden ihre Erklärung in einem durch die Krankheit des bisherigen Wärters veranlaßten Wärterwechsels und daheriger minderwertiger, allerdings nur kurze Zeit dauernder Verpflegung. Nachher zeigt die Kurve wieder die normale Form. Auch aus dieser Serie ergibt sich demnach keine Differenz zwischen dem entmilzten und normalen Tiere.

Zusammenfassende Betrachtung.

Die Tiere wurden im ganzen während 4 Monaten beoabachtet; die Gewichtsbestimmungen fielen hauptsächlich in die erste Hälfte, da ein unvorhergesehener Umstand eine weitere Verfolgung des Wachstums vermittels genaueren Wägungen illusorisch zu machen schien.

Im dritten Beobachtungsmonat wurden alle 4 Tiere von der Staupe befallen; das Wachstum war während der Dauer

der Krankheit sozusagen sistiert; die Freßlust minimal und daher auch der Ernährungszustand schlecht, das Allgemeinbefinden stark getrübt. Die Hunde zeigten einer wie der andere die ausgesprochenen Symptome der katarrhalischen Form der Staupe; Erscheinungen, die auf die nervöse oder exanthematische Form hingedeutet hätten, konnte ich in keinem der Fälle nachweisen. Die Affektion war eine äußerst heftige und akut verlaufende. In der dritten Krankheitswoche fiel diesem Würgengel des Hundegeschlechts das Normaltier der Serie I zum Opfer.

Die Sektion ergab die typischen pathologischen Veränderungen dieser Staupeform, eine Vereiterung sämtlicher Schleimhäute, Magen und Darm waren mit Eiter angefüllt.

Interessant und einer Nachprüfung wert erscheint der Umstand, daß die beiden entmilzten Tiere die Infektion relativ am besten überstanden, während das eine der Kontrolltiere verendete; es war keineswegs vor dem Ausbruch der Krankheit schwächlicher gewesen als eines der andern.

Mit 5 Wochen schien bei den drei Überlebenden völlige Heilung eingetreten zu sein und konnten dieselben weiterhin benutzt werden.

Die während dieser Zeit wöchentlich vorgenommenen Wägungen ergaben nicht nur einen völligen Stillstand in der Gewichtszunahme, sondern sogar eine Abnahme; diese Periode wurde daher von den nötigen Beobachtungsangaben ausgeschaltet.

Im Verlaufe des vierten und fünften Monats wurde das Gewicht nur mehr in Zeiträumen von 14 Tagen bestimmt. Die erhaltenen Zahlen ergaben überall eine völlig normale und mit den vorigen Angaben übereinstimmende Körpergewichtszunahme. Ich glaube daher auf ihre graphische Darstellung verzichten zu können. Es kann noch beigefügt werden, daß ich nach dieser Zeit die Tiere nicht aus den Augen verlor, sondern noch im sechsten und siebenten Monat Gelegenheit hatte die Hunde von Zeit zu Zeit zu beobachten, und daß die Möglichkeit einer noch weiter dauernden Beobachtung nicht ausgeschlossen ist.

Aus den Kurven ergeben sich wohl einzelne geringfügige Unterschiede zwischen den Kurven 1 und 2 einerseits und 5 und 6 andererseits, nicht aber zwischen den Kurvenpaaren selbst. Die Schwankungen, die sich dort finden, sind so un-

bedeutend, daß sie wohl aufs Konto der Individualitat gesetzt werden können.

Resultate von Teil I.

Eine genaue, im Anfang täglich, später in längern Perioden durchgeführte Wägung von normalen und in den ersten Tagen nach der Geburt entmilzten Hunden, sowie die sonst angestellten durch Abbildungen unterstützten Beobachtungen, ergaben während 5 Monaten keinen Unterschied im Aufwachsen.

Gestützt auf diese Resultate darf behauptet werden, daß die Milz keinen durch die bisherigen Methoden wahrnehmbaren Einfluß auf das Wachstum von Hunden ausübt.

Die Milz ist also kein Organ wie etwa die Schilddrüse und die Thymus, deren Vorhandensein oder Nichtvorhandensein die Entwicklung des jugendlichen Lebewesens in ganz bestimmter Richtung beeinflußt. Diese negative Tatsache ist von Wichtigkeit; denn sie lehrt, daß die Milz durchaus nicht bei dem Versuch, sie unter bestimmte Organe zu klassifizieren, etwa mit Schilddrüse oder Thymus — letzteres könnte als naheliegend angesehen werden — im Parallele gesetzt werden darf.

II. Teil.

Die Milz ein Organ des Eisenstoffwechsels.

Einleitung.

Gleichzeitig mit den Wachstumsversuchen wurde das Verhalten der Milz auch nach dieser Seite hin untersucht. Wie schon in der ersten Einleitung bemerkt, wurde ich von Herrn Prof. Asher auf die Möglichkeit einer Teilnahme dieses Organs am Eisenstoffwechsel mit Hinweis auf dessen hohen Eisengehalt aufmerksam gemacht und zu den nachfolgenden Untersuchungen auf Grund hiervon angeregt.

Nach Nasse zeigt die Milz alter Pferde einen Eisenreichtum bis zu 5 % des Trockenrückstandes; dieser Eisengehalt soll allerdings je nach Alter und merkwürdigerweise auch nach Geschlecht wechseln, wie Seemann angibt; er fand folgende Eisenmengen:

10 bis 100 cm lange Foeten	0,7 ‰ Fe,
1. bis 10. Woche	0,5 ‰ „
Ochsen	4,6 ‰ „
Kühe	21 bis 24 ‰ Fe.

Seemann glaubt diesen auffallend hohen Gehalt darauf zurückführen zu können, daß die Eisenkomponente des Hämoglobins in der Milz retiniert werde; während Tellyesnicky sich denselben durch die normalerweise in diesem Organ vorhandene große Blutkörperchenzahl erklärt.

Bei den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich nicht darum, die Provenienz und die Form der Bindung des Eisens festzustellen — derartige Versuche werden zurzeit von anderer Seite ausgeführt —, sondern es sollte lediglich versucht werden, die Milz auf eine Teilnahme am Eisenstoffwechsel hin zu prüfen. Diese Prüfung des Eisenstoffwechsels erschien um so notwendiger, als einerseits recht viele theoretische Anhaltspunkte für Beziehungen zwischen Hämoglobin und Milz vorhanden sind, alle Experimente bisher aber sehr widersprechende Resultate lieferten; möglichweise liegt dies an der Ungenauigkeit der bisher angewendeten Methoden, nämlich der Blutkörperchenzählung und der Hämoglobinbestimmung. Die neueren Methoden der Eisenbestimmung übertreffen jene weit an Genauigkeit.

Der Eisenstoffwechsel wurde an normalen und entmilzten jungen Hunden vermittels der Neumannschen Säureveraschung und jodometrischen Eisenbestimmung untersucht. Über den Eisenstoffwechsel bei normalen Hunden lagen Untersuchungen bereits vor.

So hat Gottlieb die Ausscheidungsverhältnisse des Eisens am Normal- und Hungertiere geprüft, meistens allerdings nach vorausgegangenen subcutanen und intravenösen Eiseninjektionen; er richtete dabei sein Hauptaugenmerk auf die Lokalisation der Ausscheidung im Darme; dabei fand er, daß

1. die Epithelien des Darmkanals (unzweifelhaft auch des Magens) die Fähigkeit besitzen, aus dem Kreislauf Eisen aufzunehmen und in den Darminhalt auszuscheiden;

2. die Ausscheidung durch den Darm nur sehr allmählich erfolge und demgemäß nach vorausgegangener Injektion lange

Zeit daure. Er betrachtet die Leber als hauptsächlichstes Eisenreservoir.

Die Milz aber wurde, soviel aus der Literatur ersichtlich, noch nie nach dieser Seite hin untersucht; es unterblieben demzufolge auch Eisenbestimmungen an entmilzten Tieren und sind demnach diese Experimente wohl die ersten in dieser Richtung.

Methodik.

Vorbemerkung.

Bishin war die Veraschung bei Fäkalanalysen stets auf trockenem Wege vorgenommen worden. Diese Art der Veraschung leistete bei gewissen Bestimmungen, sobald es sich um größere Mengen der zu eruierenden Substanz handelte, ganz gute Dienste; so war sie bei sehr eisenreichen Substanzen (z. B. Blut) wohl anwendbar; sobald es sich aber um geringere Mengen handelte, waren Fehler kaum zu vermeiden, abgesehen davon, daß sich die Anwendung dieser Methode immer sehr umständlich und zeitraubend gestaltete.

Es könnten bei der nachfolgenden und in diesem Falle einzig anwendbaren Kaliumpermanganattitration leicht dadurch Fehler entstehen, daß das dazu benutzte Zink, wenn auch noch so rein, immer Spuren von Eisen enthält, was ja bei Bestimmung größerer Eisenmengen, wie z. B. in Mineralanalysen, kaum einen Einfluß auf das Resultat ausübt; bei den geringen Eisenmengen aber, die in Stoffwechselanalysen zu bestimmen sind und deren Gewicht pro Analyse nur einige Milligramme beträgt, können diese Fehlerquellen erhebliche Abweichungen von dem wahren Eisengehalt herbeiführen.

Da demnach diese Methode eine absolute Garantie für hinreichende Genauigkeit und Sicherheit nicht zu bieten vermochte, war der Versuch zu machen, mit Hilfe einer andern das Problem in Angriff zu nehmen. Die Wahl fiel dabei auf eine neuere und noch nicht sehr allgemein angewandte Methode: Die Säureveraschung und die jodometrische Eisenbestimmung nach Neumann.

Gestützt auf Gottliebsche Angaben und einige wenige eigene Analysen des Kaninchenharnes glaubte ich auf eine

weitere Miteinbeziehung des Harnes in die Analyse verzichten zu können.

Der Harn zeigt nämlich bei den Hunden und Kaninchen einen verschwindend kleinen und auch nach Eiseninjektionen sehr niedrig und konstant bleibenden Eisengehalt; außerdem gestaltet sich die Analysierung verhältnismäßig schwierig, ja sogar bei diesen kleinsten Mengen eventuell zweifelhaft. Aus diesen Gründen wurden weiterhin nunmehr die Faeces einer Analyse unterworfen.

Die Säuregemischveraschung.

Die Neumannsche Säuregemischveraschung beruht im Prinzip darauf, daß während der ganzen Substanzzerstörung im Gegensatze zur trockenen Veraschung keine Verkohlung eintritt, weil durch ein stark wirkendes und beständig zufließendes Oxydationsmittel (z. B. das Säuregemisch) der Kohlenstoff völlig zu Kohlensäure oxydiert wird. Da verkohlte Massen bedeutend schwerer verbrennlich sind, als die ursprüngliche organische Substanz, so erfolgt bei dieser Methode die Zerstörung viel schneller, als bei der trockenen Veraschung in der Platinschale oder bei der Substanzzerstörung nach Kjeldahl.

Apparatur. Die Veraschung wird vorgenommen in einem schief liegenden Rundkolben aus Jenaerglas. Über demselben befindet sich in einem Glasringe ein Halmtrichter, welcher zweckmäßig mit einer Tropfcapillare versehen ist. Das Ganze ist an einem Stativ befestigt. Die Veraschung erfolgt unter der Kapelle, wobei der Kolben vor etwa herabfallenden Eisenpartikelchen, die sich unter Einwirkung der Säuredämpfe von metallenen Bestandteilen loslösen, am besten durch eine über der Kolbenöffnung angebrachte Glasplatte geschützt wird.

Säuregemisch. Man gießt langsam und unter Umschütteln $^1/_2$ l konzentrierte Schwefelsäure in $^1/_2$ l konzentrierte Salpetersäure, was aber infolge der starken Erhitzung höchst vorsichtig zu geschehen hat.

Abwägung der Substanz. Der Kot wird möglichst sorgfältig in eine vorher gewogene Porzellanschale gesammelt und auf die Wage gebracht. Je nach der Konsistenz ist es natürlich oft schwierig, den Gesamtkot auf die Wage zu bringen; um dies zu erreichen, benutzte ich zum Sammeln dünnflüssigen

Kotes vorher gewogene, garantiert aschefreie, mithin auch eisenfreie Filter, die hierauf selbstverständlich mitverascht werden mußten; diese aus reiner Cellulose bestehenden Filter konnten an den analytischen Resultaten nichts ändern.

Ausführung der Veraschung. Die Veraschung wird in einem gut ziehenden Abzuge ausgeführt. Die Substanz wird in dem Rundkolben mit gemessenen Mengen Säuregemisch übergossen und mit mäßiger Flamme erwärmt. Es empfiehlt sich dabei das Säuregemisch zunächst ohne Erwärmung wirken zu lassen, um einer allzu heftigen Reaktion, die sich durch ein starkes Aufbrausen kundgibt, vorzubeugen.

Sobald die Entwicklung der braunen Nitrosodämpfe geringer wird, gibt man aus dem Hahntrichter tropfenweise weiteres Gemisch hinzu und fährt damit fort, bis ein Nachlassen der Reaktion eintritt und die Intensität der braunen Dämpfe abgeschwächt erscheint.

Um zu entscheiden, ob die Substanzzerstörung beendet ist, unterbricht man das Zufließen des Gemisches für kurze Zeit und beobachtet, ob sich die Flüssigkeit im Kolben dunkler färbt oder gar noch schwärzt (infolge der Anwesenheit des noch unvollständig zerstörten Kohlenstoffes). Ist dies der Fall, so läßt man wieder Gemisch zufließen und wiederholt nach einigen Minuten die obige Probe. Wenn nach dem Abstellen des Gemisches und dem Verjagen der braunen Dämpfe die hellgelbe oder farblose Flüssigkeit sich bei weiterem Erhitzen nicht mehr dunkler färbt und auch keine Gasentwicklung mehr zeigt, dann ist die Veraschung beendet.

Ist die Flüssigkeit schwach gelb gefärbt, so soll sie nach Neumann beim Erkalten völlig wasserhell werden, was aber gewöhnlich nie ganz zutrifft; in meinen Versuchen blieb die Lösung trotz wiederholten Kochens und Säurezusatzes immer grünlich.

Sobald die nötige Klarheit erreicht ist, fügt man hierauf dreimal so viel Wasser hinzu, wie Säuregemisch verbraucht wurde, erhitzt und kocht 5 bis 10 Minuten. Dabei entweichen braune Dämpfe, die von der Zersetzung der entstandenen Nitrosylschwefelsäure herrühren.

Im Verlaufe der Untersuchungen stellte es sich heraus, daß man sich nicht immer ganz genau an die Neumannschen

Ausführungen über die Prozedur halten könnte; damit soll freilich nicht gesagt sein, daß es derselben an der nötigen Klarheit gefehlt hätte. Fäkalveraschungen waren jedenfalls in diesem Maßstabe zum erstenmal mittels dieser Methode vorgenommen worden, und es ergaben sich dabei natürlicherweise kleine Korrekturen. Neumann fügte übrigens in seinen „Nachträgen zur Säuregemischveraschung" seinen ersten Angaben selbst einige Ergänzungen bei. So gibt er an, daß, wenn die Aschenlösung Erdalkaliphosphate in größeren Mengen enthält, ein weißer Niederschlag bestehen bleibe. Ich habe diesen Niederschlag immer angetroffen, er hat sich, wenigstens ein Teil desselben, in Säure unlösbar erwiesen und blieb in der Aschenlösung als grobkörniges Residuum zurück. Der andere deutlich abgegrenzte Teil, der viel feiner und leichter war, löste sich bei der nachfolgenden Verdünnung mit Wasser wieder, war demnach nur in konzentrierter Säure unlöslich.

Ferner hatte es sich gezeigt, daß, sobald man gezwungen war, größere Kotmengen, als die von Neumann angegebene Norm, zu verarbeiten, die zur Veraschung notwendige Säuremenge viel mehr betrug, als man vorgesehen hatte. Neumann gibt an, daß man anfangs ca. 10 ccm Säure zusetzen solle; hatte ich ca. 10 g Faeces im Kolben, so war ich genötigt, gleich anfangs mindestens das 3 bis 4 fache an Säure zuzugeben, sollte die Substanzzerstörung einen richtigen Verlauf nehmen; mit der nachher durch den Hahntrichter zugetropften Säure betrug die Menge Säuregemischs, die zur vollständigen Veraschung erforderlich war, ungefähr 60 bis 80 ccm! Neumann hat bei seinen Faecesanalysen nie größere Kotmengen als 3 bis 4 g auf einmal verarbeitet; bei den täglichen Kotmengen, die ich zu analysieren hatte, und die zwischen 6 bis 68 g schwankten, war es unmöglich in solch kleinen Mengen zu veraschen. Ich hatte unter anderem auch versucht, nur einen Teil des Kotes in Analyse zu nehmen und das erhaltene Resultat mit der Zahl der Teile zu multiplizieren; hierbei erhielt ich jedoch entweder sehr niedrige oder dann sehr hohe Werte, so daß angenommen werden mußte, daß das abgeschiedene Eisen in den Faeces nicht gleichmäßig verteilt sei; eine homogene Mischung nachträglich herzustellen, war aber wegen der wechselnden Konsistenz des Kotes sehr schwierig, und es

wurde der großen Unsicherheit halber dieses sonst sehr große Vorteile bietende partielle Verfahren in der Folge nicht mehr angewandt.

Ich war nun aber gezwungen, stets 10 bis 15 g Faeces auf einmal zu veraschen, wollte ich die täglichen Kotmengen folgenden Tags völlig bewältigen. Bei Mengen über 15 g mußte, um das Analysenresultat nicht in Frage zu stellen, in Portionen gearbeitet werden. Die von Neumann angegebene Zeitdauer einer Analyse konnte in einem einzigen Falle, wo es sich um die Analysierung von 4 g Faeces handelte, eingehalten werden; sie dauerte 4 Stunden.

Jodometrische Bestimmung des Eisens.

Wie schon im vorigen Abschnitt, die Veraschung betreffend, folgte ich auch in diesem im wesentlichen wieder den Ausführungen Neumanns.

Nach durchgeführter Säuregemischveraschung mußte nun das in Lösung befindliche Eisen bestimmt werden; dazu wurde die jodometrische Bestimmung benutzt, die den Eisengehalt genauer und einfacher zu ermitteln ermöglicht, als die Kaliumpermanganatmethode; überdies hat man den Vorteil, daß man das Eisen, welches nach der Veraschung als Oxyd vorliegt, in dieser Form direkt für die Bestimmung verwenden kann, ohne vorher eine Reduktion vorzunehmen.

Im Prinzip beruht diese Methode darauf, daß in der durch die Säuregemischveraschung erhaltenen Aschenlösung ein Niederschlag von Zinkammoniumphosphat erzeugt wird, der quantitativ alles Eisen mitfällt. Durch das so abgetrennte Eisenoxyd werden nach dem Lösen in Salzsäure äquivalente Mengen Jod frei gemacht, welche nach Stärkezusatz mit einer etwa $^{n}/_{250}$-Thiosulfatlösung gemessen werden; dieselbe wird gegen eine unter Säurezusatz hergestellte, sehr verdünnte Eisenchloridlösung eingestellt.

Erforderliche Lösungen.

1. Eisenchloridlösung, enthaltend 2 mg Fe in 10 ccm. Dieselbe wird hergestellt, indem man genau 20 ccm der Frese-

niusschen von Kahlbaum bezogenen Eisenchloridlösung, welche 10 g Eisen im Liter enthält, in einen Litermeßkolben fließen läßt, mit etwa 2 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt und dann genau zum Liter auffüllt. Diese Lösung ist lange unverändert haltbar, man verwahrt sie zweckmäßig in einer braunen Flasche.

2. Etwa $^{n}/_{250}$-Thiosulfatlösung. Man löst 40 g Natriumthiosulfat in etwa 1 l Wasser; Aufbewahrung in brauner Flasche. Diese Lösung verdünnt man für den Gebrauch von etwa einer Woche um das 40fache, z. B. 5 ccm auf 200 ccm.

3. Zinkreagens. Etwa 25 g Zinksulfat und etwa 100 g Natriumphosphat werden jedes für sich in Wasser gelöst und die Lösungen in einem Litermeßkolben vereinigt. Der entstandene Niederschlag von Zinkphosphat wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure gerade gelöst und die Lösung sodann zum Liter aufgefüllt.

Alle zur Eisenbestimmung benutzten Reagenzien müssen frei von Eisen sein.

Titerstellung der Thiosulfatlösung.

Da die sehr verdünnte Thiosulfatlösung nicht unverändert haltbar ist, mußte bei jeder Bestimmung der Titer derselben festgestellt werden.

Dies geschieht folgendermaßen:

10 ccm Eisenchloridlösung werden in einem Kolben mit etwas Wasser, einigen Kubikzentimetern Stärkelösung und etwa 1 g (nach dem Augenmaß) Jodkalium versetzt, auf etwa 50 bis 60° erwärmt und mittels der Thiosulfatlösung titriert, bis die blaue Farbe über rotviolett verschwindet, oder noch besser die Lösung völlig klar wird, um ein sofortiges Rezidivieren in Violett zu vermeiden. Die verbrauchten Kubikzentimeter Thiosulfatlösung entsprechen dann gerade 2 mg Fe. Nach einigen Minuten (ich nahm immer 5 Minuten als Ziel an) färbt sich die Lösung wieder violett.

Es ist zweckmäßig eine Thiosulfatlösung nur so lange zu benutzen, als sich der Titer nicht um mehr als den vierten Teil seines Wertes verändert hat; entsprechen also anfangs 8 ccm 2 mg Fe, so kann man die Lösung benutzen bis 10 ccm

2 mg Fe entsprechen. Neumann nimmt dabei an, daß dieser Zeitpunkt nach 3 bis 4 Wochen erreicht sei; indessen hat sich gezeigt, daß sich der Titer innerhalb einer Woche um die Hälfte seines ursprünglichen Wertes ändern kann; ich nahm, um nicht bei jeder Bestimmung eine neue Lösung ansetzen zu müssen, als obere Veränderungsgrenze 12 an.

Ausführung der Eisenbestimmung. Die Substanz wird der Säuregemischveraschung unterworfen. Die mit Wasser verdünnte und etwa 10 Minuten gekochte Lösung wird nach dem Abkühlen mit 20 ccm Zinkreagens versetzt. Hat man in großen Mengen Substanz sehr wenig Eisen, so muß man genau abgemessene 10 ccm Eisenchloridlösung vor dem Hinzufügen des Zinkreagens hineingeben, um eine vollständige, der Eisenmenge entsprechende Jodabscheidung zu erhalten. Man zieht in diesem Falle von Kubikzentimetern Thiosulfatlösung, welche bei der Haupttitration verbraucht wurden, die Anzahl Kubikzentimeter ab, welche bei der Titerstellung von 10 ccm Eisenchloridlösung beansprucht wurden. Nachdem 20 ccm Zinkreagens zugefügt worden sind, wird die Lösung so lange unter Abkühlung mit Ammoniak versetzt, bis der weiße Zinkniederschlag gerade bestehen bleibt (20 ccm Zinkreagens sind ausreichend für 5 bis 6 mg Fe, da aber gewöhnlich größere Eisenmengen in Betracht kamen, wurde entsprechend mehr Zinkreagens zugesetzt). Bis zur annähernden Neutralisation nimmt man konzentriertes, dann verdünntes Ammoniak. Nun gibt man ein wenig Ammoniak im Überschuß hinzu, bis der weiße Zinkniederschlag gerade verschwindet, und erhitzt auf einer Asbestunterlage zum Sieden. Wenn krystallinische Trübung eingetreten ist, erhitzt man noch etwa 10 Minuten; hierbei ist Vorsicht notwendig, da, besonders wenn große Ammoniakmengen zur Neutralisation verwendet wurden und ein starker Niederschlag entstanden war, die Flüssigkeit zuweilen hoch geschleudert wird, was unter Umständen das Springen des Kolbens zur Folge haben kann. Diese lästige Erscheinung verhindert man am besten dadurch, daß man die Flüssigkeit in starkem Sieden erhält. Der krystallinisch abgeschiedene Niederschlag setzt sich schnell ab und kann leicht durch Dekantieren getrennt werden. Man setzt den Rundkolben auf einen Stativring, gießt die heiße Flüssigkeit durch ein kleines, aschefreies anliegendes Filter von

3 bis 4 ccm Radius und prüft eine kleine Probe des Filtrates mit Salzsäure und Rhodankalium; es darf dabei keine oder nur äußerst schwache Rotfärbung eintreten. War die Färbung deutlich rot, so muß man das schon Filtrierte zurückgießen, nochmals erhitzen und wieder prüfen. Der Niederschlag im Rundkolben wiederum etwa dreimal durch Dekantieren mit heißem Wasser ausgewaschen; das letzte Waschwasser darf dann, wenn man etwa 5 ccm davon mit einigen Krystallen Jodkalium, Stärkelösung und einem Tropfen Salzsäure versetzt, keine oder nur äußerst schwache Violettfärbung zeigen (Prüfung auf jodfreimachende Substanzen, z. B. salpetrige Säure). Nunmehr wird der Trichter mit dem Filter auf den Rundkolben, in dem sich noch die Hauptmenge des Niederschlages befindet, gesetzt, das Filter zweimal mit verdünnter heißer Salzsäure gefüllt und dann mit heißem Wasser 4 bis 5mal ausgewaschen; eine Probe des letzten Waschwassers darf ebensowenig wie das Filter mit Rhodankalium eine Rotfärbung zeigen. Jetzt befindet sich das ganze Eisen in salzsaurer Lösung im Kolben. Da aber für die Titration die Flüssigkeit nur schwach sauer sein darf, so wird zunächst mit verdünntem Ammoniak neutralisiert, bis gerade wieder der weiße Zinkniederschlag bestehen bleibt, und dann durch portionenweises Zugeben von je 10 Tropfen verdünnter Salzsäure gerade wieder gelöst (eine völlig klare Lösung, wie sie Neumann beschreibt, ist infolge des bereits erwähnten säureunlöslichen Niederschlages ausgeschlossen; die beiden Niederschläge sind jedoch leicht auseinander zu halten). Diese Lösung wird sodann genau in derselben Weise titriert, wie es für die 10 ccm Eisenchloridlösung bei der Titerstellung der Thiosulfatlösung angegeben ist.

Berechnung. Dieselbe ist äußerst einfach; ergab die Titerstellung, daß 10 ccm Eisenchloridlösung (= 2 mg Fe) 9,2 ccm Thiosulfatlösung erforderten, und wurden bei der Haupttitration 12,5 ccm Thiosulfate verbraucht, so berechnete sich aus den Proportionen:

$$9{,}2 : 2 = 12{,}5 : x$$
$$x = 2{,}72 \text{ mg Fe.}$$

Nachtrag. Um immer Gewißheit über die Zuverlässigkeit und Sicherheit dieser Methode zu haben, wurden von Zeit zu Zeit sogenannte Kontrollanalysen ausgeführt; in der Weise,

daß mir eine bestimmte Menge Eisenchloridlörung zur Untersuchung übergeben wurde, deren Eisengehalt mir unbekannt war, während sie der Verabfolgende kannte. Die Resultate stimmten in allen Fällen bis aufs Milligramm.

Um ferner einige Übung in der Anwendung und Technik dieser Methode zu erlangen, wurden vorerst einige Eisenstoffwechselbestimmungen am normalen Kaninchen vorgenommen. Die Resultate gedachte ich dabei zuerst nicht zu verwerten, obschon sie einwandfrei waren, da ich glaubte, es seien derartige Versuche am Kaninchen schon längst gemacht worden; indessen konnte ich später darüber keine Angaben finden und schien es mir, daß die Veröffentlichung der wenigen Befunde doch imstande wäre, einen Einblick in die diesbezüglichen Verhältnisse bei Nagetieren zu gewähren.

Versuche am Kaninchen.

Anordnung. Das Versuchstier wurde in einem eigens zu diesem Zwecke von der Firma Schaerer & Cie. nach Angabe von Prof. Asher angefertigten eisenfreien Stoffwechselkäfig gebracht. In einen gewöhnlichen Kaninchenkäfig kam ein eigener Einsatz von der halben Höhe des Drahtkäfigs. Der Einsatz bestand aus einer völlig eisenfreien, von Harn und Kot nicht angreifbaren Masse, Xylolith genannt. Für den erforderlichen Harnabfluß sorgte die siebartige feine Durchlöcherung und trichterförmige Gestaltung der Bodenplatte; der Harn wurde in einem untergestellten Glasgefäß aufgefangen. So war durch die Trockenhaltung des Käfigbodens das Sammeln des Kotes leicht und gründlich durchführbar.

Als Futter wurde Spinat in Tagesrationen von 200 g verabreicht.

Der Kot wurde vor der jeweiligen Fütterung gesammelt und dabei namentlich darauf gesehen, daß nicht etwa Futterpartikel mitgingen, die leicht zu Fehlern in den Resultaten hätten führen können. War die Kotmenge eines Tages ganz gering, so wurde sie mit denen des zweiten, dritten oder auch vierten Tages verarbeitet, wobei natürlich dann ein Tagesmittel angenommen werden mußte.

Kotanalysen.

Zeitdauer			Eisenmenge	Tagesdurchschnitt
I.	Periode	1 Tag	0,78 mg	0,78 mg
II.	„	2 Tage	3,20 „	1,60 „
III.	„	4 „	7,94 „	1,97 „

Der Harn der ersten und zweiten Periode wurde ebenfalls analysiert, wobei in dem der ersten Periode kein Eisen und in dem der zweiten Periode nur Spuren nachgewiesen werden konnten. Demzufolge wurden weitere Harnuntersuchungen unterlassen.

Die erhaltenen Werte sind sehr niedrige; aus den drei Tagesdurchschnitten der jeweiligen Perioden ergibt sich eine tägliche Eisenausscheidung von 1 bis 2 mg; diese Zahlen erscheinen um so kleiner, als der Spinat ein relativ eisenreiches Futter repräsentiert. Angesichts der wenigen vorliegenden Resultate ist es natürlich unmöglich, hierauf gestützt, weitere Schlüsse und Folgerungen zu tun; hierzu bedarf es umfangreicherer Untersuchungen beim Kaninchen und den ihm in der Ernährungsweise verwandten Wiederkäuer.

Versuche an Hunden.

Zu diesen Untersuchungen wurden dieselben Tiere wie in den Wachstumsversuchen benutzt und ihre Einteilung ebenfalls beibehalten.

Das Befinden der Versuchstiere war vor der Staupeaffektion ein vorzügliches gewesen, so daß die Ergebnisse, als von gesundheitlich völlig normalen Tieren stammend, betrachtet werden können: Während der ganzen Dauer der Krankheit unterblieben auch diese Untersuchungen; sie wurden erst nach deren gänzlichen Abheilung wieder aufgenommen, ausgenommen natürlich am verendeten Tiere.

Anordnung. Zum Aufenthalt diente dem jeweiligen Versuchstier ein Stoffwechselkäfig, der den Anforderungen betreffs Eisenfreiheit in einfacher und praktischer Weise entsprach. Der Boden hatte ein Flächenmaß von ca. 1,5 qm. Der Käfig war demnach in Anbetracht der geringen Größe der Versuchstiere geräumig genug. Boden und Wände bestanden aus dicken

Glasplatten. Eine geringe Neigung der Bodenplatte bewirkte einen sofortigen Harnabfluß; um ein Mitentweichen des Kotes zu verhüten, waren entsprechende Einrichtungen getroffen; in dem untergestellten Harngefäß konnten in der Folge nie Faecesteile gefunden werden. Dieser Stoffwechselkäfig erwies sich als für meine Zwecke sehr geeignet; er war immer trocken, was das Sammeln des Faeces erleichterte und auch für das Tier selbst von Vorteil war.

Als Futter wurde wie vorher ein Gemisch von Milch, Weizen- und Maismehl, gut gekocht, verabreicht; diese Nahrung erwies sich aber bald als für meine Zwecke nicht geeignet. Sie hatte einen meist dünnflüssigen und sehr voluminösen Kot zur Folge, was bis jetzt weiter keine Bedeutung gehabt hatte; nunmehr, wo es sich darum handelte, diesen Kot peinlich genau zu sammeln, war dies ein Ding der Unmöglichkeit geworden; das Volumen spielte insofern eine Rolle, als die Veraschung viel längere Zeit in Anspruch nahm, als man angenommen hatte. Man mußte portionenweise analysieren, und da man im Tage höchstens 10 Stunden zu arbeiten imstande war, hätte man Faeces tagelang aufbewahren müssen, bis an sie die Reihe gekommen wäre.

Es mußte daher unbedingt ein anderes Futtermittel in Aussicht genommen werden, von dem man verlangen konnte, daß es einen viel konsistenteren, trockeneren und nicht zu voluminösen Kot liefere; da kam vor allem das Fleisch in Betracht und wurde der Versuch sofort mit frischem Pferdefleisch gemacht. Er fiel in jeder Weise zufriedenstellend aus. Die Tiere nahmen es jeweilen mit großer Begierde auf; der dunkelgefärbte Kot war in den meisten Fällen trocken und namentlich an Menge viel geringer. Diese Umstände erleichterten natürlich das Sammeln in hohem Maße. Diese Kost wurde anscheinend sehr gut vertragen und viel besser ausgenützt als die vorige.

Futter und Wasser wurden täglich einmal in irdenen Gefäßen gereicht. Die tägliche Futterration betrug ca. 250 g und war frei von Knochen und sonstigen unverdaulichen Bestandteilen; später wurden in Anbetracht der Größe der Tiere 300 g verabfolgt. Wie schon bemerkt, wurde diese Nahrung gierig und momentan verzehrt, so daß eine Vermischung mit Kot,

wie sie bei der vorherigen Fütterungsweise nicht ausgeschlossen gewesen war, nicht mehr in Betracht fallen konnte.

Wie die Futtergefäße, so waren auch sämtliche Gegenstände, welche mit dem Kot in Berührung kamen, vollkommen eisenfrei. Die Faeces wurden sofort nach dem Sammeln gewogen und, wenn immer möglich, sofort in Veraschung genommen.

Das Versuchstier wurde gewöhnlich am Abend in den Käfig gesetzt und nach 24 Stunden, d. h. anderntags um dieselbe Zeit der Kot gesammelt und das Tier gefüttert.

Der gleiche Hund blieb für gewöhnlich 3 bis 6 Tage im Stoffwechselkäfig, worauf er wieder in seine Boxe versetzt wurde und sein Antagonist an seine Stelle trat.

Die Untersuchungen fanden sowohl am Futter- als auch am Hungertiere statt; es wurden ferner nach 2 Monaten Unterbruch nochmals Versuche vorgenommen, zwecks Feststellung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins der früheren Unterschiede.

Sie zerfallen demnach in 3 Hauptgruppen:

I. Fütterungsversuche,
II. Hungerversuche,
III. Versuche nach 2 Monaten.

Jede dieser Hauptgruppen zerfällt ihrerseits wieder in die Versuche am milzlosen und die am Kontrolltier, und diese endlich können weiterhin aus ein oder mehreren Einzelversuchen bestehen.

Diese Untersuchungen wurden zum größeren Teil an den Hunden der Serie II durchgeführt; diejenigen, welche an der Serie I vorgenommen wurden, hatten wesentlich die ersteren zu bestätigen.

I. Fütterungsversuche an den Hunden der Serie II.

a) Am entmilzten Tier.

1. Versuch.

Versuchstage	Futterration g	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	250	12,9	29,22	24,58
2. „	250	11,1	19,94	

2. Versuch.

Versuchstage	Futterration g	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	250	9,5	22,70	20,93
2. „	250	28,5	22,08	
3. „	250	18,2	18,00	
4. „	250 + 1 g F. c. s.	9,2	22,18	
5. „	250	5,0	26,09	
6. „	250	8,5	18,18	

Im Verlaufe dieser Versuchsserie, am vierten Tage wurde dem Hunde mit dem Futter 1 g Ferrum carbonicum saccharatum verabreicht. Der Gehalt an reinem Eisen beträgt bei diesem Eisenpräparate nach der Pharmacopoea helvetica 10%; somit wurden dem Hunde per os ca. 100 mg Eisen verabreicht. Das Präparat wurde in ein Stückchen Fleisch gehüllt und auf diese Weise vollständig abgeschluckt. Es sollte damit die Frage der Ausscheidung dieses Eisenüberschusses beim entmilzten und normalen Tier untersucht werden; es mußte zu dem Zwecke dem Kontrolltier in analoger Weise Eisen verabreicht werden.

Der erste Versuch zeigte überraschend hohe Zahlen. Die Eisenausscheidung des ersten Tages erwies sich als die höchste in sämtlichen Versuchsreihen, in 12,9 g Faeces fanden sich 29,22 mg Fe. Die Analyse der 11,1 g Kot des zweiten Versuchstages ergab 19,94 mg Fe, sie hielt sich demnach um ca. 10 mg niedriger als die erstere, immerhin befand sich auch diese Ziffer noch weit über den Gottliebschen Zahlen vom normalen Hunde.

Der zweite Versuch zeigte Werte, die sich zwischen den beiden bereits gefundenen bewegten.

Das Mittel der drei ersten Versuchstage betrug 20,93 mg Fe. Am vierten Tage wurde, wie bereits erwähnt, das Eisenpräparat verabfolgt. Es trat sofort eine Steigerung in der Ausscheidung auf. Von den 18,00 mg des dritten Tages stiegen die Werte bis zum fünften Tage auf 26,09 mg Fe, um am sechsten Tage wieder auf 18,18 mg zurückzukehren. Es hatte demnach eine bescheidene Mehrausscheidung von ca. 8 mg in zwei Tagen stattgefunden.

b) Am Kontrolltier.

1. Versuch.

Versuchstage	Futterration g	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	250	8,5	6,44	9,32
2. „	250	17,5	10,33	
3. „	250	15,5	11,20	
4. „	250 + 1 g F. c. s.	12,0	20,16	
5. „	250	11,5	14,19	

Der erste Versuch am Kontrolltier zeitigte Resultate, die von denen des milzlosen sehr stark differierten. Namentlich der Befund vom ersten Versuchstage, der 6,44 mg Fe ergab, zeigt gegenüber den 29,22 mg Fe des ersten Versuchstages beim entmilzten Tiere den Unterschied in evidenter Weise. Die Zahlen stiegen in den folgenden zwei Tagen etwas, immerhin nur so viel, daß das Mittel der drei Tage unter 10 mg blieb. Dem täglichen Mittel von 9,32 mg Fe beim normalen Tiere stehen die täglichen Mittel 24,58 mg Fe und 20,93 mg Fe beim entmilzten Tiere gegenüber; es bestand demnach bei dem milzlosen Hunde eine mehr als doppelt so hohe Eisenausscheidung wie beim Normaltiere. Nach Verabreichung von 1 g Ferr. carb. sacch. machte sich auch beim Kontrolltier eine Steigerung in der Eisenausscheidung geltend, die in gleicher Weise auch wieder zu fallen schien; nach diesem einzelnen Versuche wären in diesem Punkte keine Unterschiede bemerkbar; indessen ist dieser einzelstehende Versuch absolut nicht maßgebend; es ist sogar wahrscheinlich, daß bei Verabreichung größerer Eisenmengen per os oder mittels subcutanen oder intravenösen Injektionen auch hier Unterschiede auftreten; diese Frage konnte an dieser Stelle nicht weiter verfolgt werden; sie ist, wie andere verwandte Probleme, nach Abschluß dieser Untersuchungen von anderer Seite in Angriff genommen worden, so daß in kurzem auch hierüber Klarheit zu erwarten ist.[1])

[1]) Alles nähere hierüber in der nachfolgenden 12. Mitteilung.

II. Versuche an Hungertieren.

Man konnte gegen die Versuche am gefütterten Tiere den Einwand erheben, daß mit unverdauten Futterbestandteilen auch Eisen den Darmtractus unresorbiert passieren könne. Wenn dies schon lange nicht in dem Maße der Fall sein konnte, wie anläßlich der ersten vorwiegend vegetabilischen Fütterung, so konnte er doch auch hier bestehen.

Im ferneren konnte man annehmen, daß beim entmilzten Tiere wegen der fehlenden Milz eine schlechtere Ausnutzung der Nahrung stattgefunden hat, welch letzterer Einwand durch die Schiffschen Theorien betreffs Beteiligung der Milz an der Verdauung eine gewisse Stütze erhielt.

Die Resultate wären demnach alle, namentlich beim entmilzten Tiere, zu hoch ausgefallen.

Um diesen Einwänden zu begegnen und sie ihrer Hauptstütze zu berauben, wurden sogenannte Hungerversuche, wie sie schon von Gottlieb und vielen andern ausgeführt worden waren, vorgenommen.

Das Versuchstier wurde, nachdem es zuvor bereits einen Tag gefastet hatte (um direkt Hunger- und nicht den vegetabilischen oder Fleischkot zu erhalten), in den Käfig gesetzt und dann zwei bis drei Tage bei täglicher Wasserreichung belassen. Es war somit undenkbar, daß irgendwelches Eisen den Körper hätte unresorbiert passieren können; alles abgeschiedene Eisen mußte aus dem tierischen Organismus selbst stammen. Der Kot glich vollkommen dem Fleischkot der Fütterungsversuche, was dadurch erklärlich wird, daß das Tier während des Hungerstadiums von seinem eigenen Körpereiweiß zehrte. Bei reichlicher Fleischkost stammt, wie bekannt (siehe Voit, Physiologie des Stoffwechsels Hermanns Handbuch, Bd. 6), die große Eisenmenge des Kotes aus dem genossenen Fleische. Auch beim Hungertiere ist wohl das eigene Körperfleisch die Hauptquelle des ausgeschiedenen Eisens. Ein sehr kleiner Teil des ausgeschiedenen Eisens mag anderer Herkunft sein, genauere Angaben hierüber liegen zurzeit überhaupt nicht vor.

Die Hungerperioden waren mit zwei bis drei Tagen Dauer nichts außergewöhnliches, da bekanntermaßen der Hund mehrere

Wochen zu hungern imstande ist, ohne hierbei allzu große Schwächesymptome zu zeigen.

Am Anfange dieser Hungerversuche machte sich aber bald ein völlig unerwarteter Übelstand unangenehm bemerkbar. Ich fand nämlich während zwei bis drei Tagen manchmal keinen Kot, und glaubte zuerst an eine durch die mangelnde Nahrungszufuhr bedingte Retention; ich konnte aber bald feststellen, daß die Tiere ihre eigenen Faeces aufnahmen. Durch Anbringen von gutsitzenden Maulkörben glaubte ich diese üble Gewohnheit völlig beseitigen zu können, und in der Tat konnten weiterhin auch nicht die geringsten auf eine Wiederholung hindeutende Anzeichen wahrgenommen werden; der Kot konnte wieder ziemlich regelmäßig gesammelt werden. In einem Falle wurde derselbe bestimmt bis zum zweiten Tage retiniert. Bei weiteren Versuchen, die im Institut im Gange sind, und über welche in der nachfolgenden 12. Mitteilung berichtet werden wird, zeigte sich, daß trotz Maulkorb und konstanter Aufsicht mehrere Tage kein Kot gesetzt wurde. Die Tatsache, daß der hungernde Hund viele Tage lang keinen Kot absetzt, ist aus zahlreichen Stoffwechselversuchen bekannt. Immerhin möchte ich auf die Tatsache hinweisen, daß gelegentlich Hunde ihren eigenen Kot verzehren, so daß bei Versuchen, wo die im Kot vorkommenden Stoffmengen entscheidend für das Gesamtresultat sind, das Anlegen eines Maulkorbes notwendig sein dürfte.

Versuche mit Serie II.

a) Am entmilzten Tier.

Versuchstage	Futterration	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	—	8,5	21,25	25,41
2. „	—	8,5	28,84	
3. „	—	7,5	26,13	

b) Am Kontrolltier.

Versuchstage	Futterration	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	—	6,0	6,02	—
2. Tag	—	4,5	—	—

Zu dieser letzten Tabelle muß bemerkt werden, daß der Grund, weshalb nur ein Resultat vorliegt, darin zu suchen ist, daß es sich hierbei um dasjenige Tier handelte, von dem unter drei verschiedenen Malen kein Kot zu bekommen war; da die Zeit drängte, mußte auf weitere Analysen verzichtet werden, nachdem unglücklicherweise zuvor die zweite von den beiden einzigen Analysen ein Fehlresultat ergeben hatte. Übrigens waren ja Hungerversuche am Normaltier schon von Gottlieb ausgeführt worden und können die dort erhaltenen Werte, die übrigens den einzigen vorliegenden vollauf bestätigen, die hier entstandene Lücke ausfüllen. Die gleichen Versuche wurden überdies an der Serie I ausgeführt und werden die erhaltenen Resultate im Anschluß an diese weiter erörtert.

Versuche mit Serie I.

a) Am entmilzten Tier.

Versuchstage	Futterration	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	—	24,0	23,88	22,25
2. „	—	17,0	20,63	

b) Am Kontrolltier.

Versuchstage	Futterration	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. bis 3. Tag	—	I. P. 6,0	6,95	10,03
	—	II. P. 10,0	4,06	
	—	III. P. 21,5	9,04	

ad b) Da bei diesem Tiere ebenfalls der Verdacht bestand, daß es seinen Kot aufnehmen könnte, wurde derselbe jeweilen sofort nach der Defäkation entfernt; dies geschah während zwei Tagen unter drei Malen, da die Faeces sofort nach ihrer Entfernung in Veraschung genommen wurden, so ergaben sich von zwei Tagen drei verschiedene Portionen (in der Tabelle I. P., II. P., III. P.). Wollte man daraus das tägliche Mittel ziehen, so war einfach durch zwei zu dividieren.

Die Hungerversuche haben sowohl bei Serie II wie bei Serie I den gehegten Erwartungen in überraschender Weise entsprochen; es hat sich keine von den Befürchtungen bewahrheitet. Schon der erste unternommene Versuch am entmilzten Tiere der Serie II zeigte die für die Fütterungsversuche charakteristischen hohen Eisenwerte, am

1. Tage bei 8,5 g Faeces 21,25 mg Fe; am
2. Tage bei ebenfalls 8,5 g Faeces 28,84 mg Fe; und am
3. Tage bei 7,5 g Faeces 26,13 mg Fe, Werte, die sich mit 25,41 mg Fe täglichen Mittels sogar höher stellen als die bisher gefundenen.

Das Kontrolltier der Serie II zeigt nach dem einzelnen Befunde ebenfalls keine wesentlichen Abweichungen von den vorherigen, mit 6,02 mg Fe pro Tag stimmt es vollkommen mit den Gottliebschen Zahlen überein.

Die Versuche an Serie I, die beide von Mißgeschick und Zufälligkeiten, wie sie die der Serie II betroffen, verschont blieben, ergänzten die letztern und bestätigten deren Richtigkeit voll und ganz.

Das entmilzte Tier schied pro Tag durchschnittlich 22,25 mg Fe aus, verhielt sich also gleich wie das milzlose der Serie II.

Das Kontrolltier zeigte im täglichen Mittel einen dem Futtertier entsprechenden Wert, das letztere schied im Durchschnitt 9,32 mg Fe aus, das erstere 10,03 mg Fe.

Die von den Hungertieren erhaltenen Eisenwerte stimmen demnach mit den vom gefütterten Tiere erhaltenen in allen Punkten überein, es kann somit mit Sicherheit angenommen werden, daß das abgeschiedene Eisen in allen Fällen von dem Individium selbst stammte, resp. vorher resorbiert worden war, und nicht etwa den Darmtractus, sei es nun wegen der fehlenden Milz oder mit unverdauten Futterbestandteilen, unresorbiert passiert hatte.

III. Versuche nach zwei Monaten.

Es war nicht ohne Interesse, zu prüfen, ob die Tatsache, daß entmilzte Tiere mehr Eisen ausscheiden als normale, sich auf längere Zeit erhalte, oder ob dieselbe nach einiger Zeit wieder verschwinden würde; es war ja möglich, daß innerhalb

kürzerer oder längerer Zeit diese differenten Zahlen zwischen dem Entmilzten einerseits und dem Normalen andererseits sich wieder mehr und mehr infolge der Kompensation durch ein anderes Organ ausglichen. Es wurden zu dem Zwecke $2^1/_2$ Monate nach dem Abschluß der beschriebenen Versuche neuerdings analoge Untersuchungen vorgenommen.

Die Versuchstiere waren ungefähr um ihre ganze damalige Körpergröße herangewachsen und waren völlig gesund. Vom Hungerversuch wurde hierbei abgesehen, da ja die Übereinstimmung in den Resultaten durch die bereits ausgeführten erwiesen war, mithin derselbe für meine Versuchszwecke von keiner Notwendigkeit gewesen wäre.

Die Tiere erhielten nunmehr entsprechend ihrer Größe statt 250 g Pferdefleisch deren 300 g. Im übrigen blieb das Verfahren dasselbe.

Versuche mit Serie II.

a) Am entmilzten Tier.

Versuchstage	Futterration g	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	300	16,5	16,16	16,81
2. „	300	68,0	15,76	
3. „	300	30,0	18,52	

b) Am Kontrolltier.

Versuchstage	Futterration g	Kotmenge g	Fe-Ausscheidung mg	Tägl. Mittel mg
1. Tag	300	35	8,47	9,28
2. „	300	62	10,09	

Bei den großen Kotmengen, wie sie namentlich in diesen Versuchen auftraten, nahmen die Schwierigkeiten der Analysierung in hohem Maße zu. Vor dem portionenweisen Verfahren schreckte einen der dazu nötige gewaltige Zeitaufwand zurück; nimmt man beispielsweise an, daß man zur Analyse von 5 g Faeces (welche Menge Neumann als Optimum für die

Verarbeitung bezeichnet) ca. 3 Stunden brauche, so würden, wollte man 60 g Faeces in Portionen von je 5 g. veraschen, dazu 36 Stunden nötig sein, und das für die Analysierung einer 24stündigen Kotmenge!

Nachdem ich versucht hatte, 30 g auf einmal in Arbeit zu nehmen und dieser Versuch vollständig fehlgeschlagen war, war ich wohl oder übel genötigt, wieder meine Zuflucht zu Portionen von 10 bis 20 g zu nehmen. Störend wirkten bei diesen Analysen hauptsächlich immer die großen Säuremengen, die verwendet werden mußten. Aus diesen Tabellen geht hervor, daß die Zahlen beim entmilzten Tiere etwas zurückgingen, aber relativ immer noch hoch über denjenigen des Kontrolltieres stehen. Das milzlose Tier schied mit 16,5 g Faeces 16,16 mg Fe aus, mit 68 g Faeces 15,76 mg Fe und mit 30 g Faeces 18,52 mg Fe. Im Mittel somit pro Tag 16,81 mg Fe. Das Kontrolltier schied aus mit 35 g Faeces 8,47 mg Fe und mit 62 g Faeces 10,09 mg Fe, im Mittel pro Tag 9,28 mg Fe, also etwas mehr als die Hälfte von dem des milzlosen.

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß die Kotmenge in gar keinem Verhältnis steht zu der Menge des ausgeschiedenen Eisens, wie das auch schon aus den früheren Befunden ersichtlich ist. So wurden in 68 g Kot nur 15,76 mg Fe analysiert, während in 16,5 g deren 16,16 mg Fe gefunden wurden.

Gestützt auf die Befunde am entmilzten Tier nach $2^1/_2$ Monaten Zwischenzeit ist die Möglichkeit einer gewissen Ausgleichung mit der Zeit nicht ganz von der Hand zu weisen, denn der Durchschnittswert von 16,81 mg Fe steht doch immerhin um einige Milligramme unter dem niedrigsten der früheren mittleren Befunde, 20,93 mg Fe; nur erscheint der Zeitpunkt der völligen Ausgleichung in den Eisenausscheidungen des entmilzten und normalen Tieres, angenommen, dieselben würden im gleichen Maße, wie bishier beobachtet, weiterschreiten, in ziemliche Ferne gerückt. Ob und inwieweit diese Annahme zutrifft, werden die in der nachfolgenden 12. Mitteilung berichteten Untersuchungen lehren.

Resultate von Teil II.

Um die Ergebnisse des zweiten Teiles der vorliegenden Untersuchungen etwas übersichtlicher zu gestalten, seien die erhaltenen Einzelresultate in tabellarischer Anordnung zum Schlusse kurz zusammengestellt.

Gesamttabelle.

Entmilztes Tier. Kontrolltier.

Versuchstage	Kotmenge g	Fe-Abscheidung	Mittel pro Tag mg	Versuchstage	Kotmenge g	Fe-Abscheidung	Mittel pro Tag mg	Bemerkungen
1. Tag	12,9	29,22	24,58					Fütterungsversuche
2. „	11,1	19,94						
1. „	9,5	22,70	20,93	1. Tag	8,5	6,44	9,32	
2. „	28,5	22,08		2. „	17,5	10,33		
3. „	18,2	18,00		3. „	15,5	11,20		
4. „	9,2	22,18		4. „	12,0	20,16		Zugesetzt 1,0 Ferr.
5. „	5,0	26,09		5. „	11,5	14,19		carb. sacch.
6. „	8,5	18,18						(100 mg Fe)
1. „	8,5	21,25	25,41	1. „	6,0	6,03		Hungerversuch
2. „	8,5	28,84						Serie II
3. „	7,5	26,13						
					6,0	6,95	10,03	Hungerversuch
1. „	24,0	23,88	22,25	1. bis	10,0	4,06		Serie I
2. „	17,0	20,63		3. Tag	21,5	9,04		
1. „	16,5	16,16	16,81	1. „	35,0	8,47	9,28	$2^1/_2$ Monate später!
2. „	68,0	15,76		2. „	62,0	10,09		
3. „	30,0	18,52						

Gestützt auf vorstehende Untersuchungen lassen sich verschiedene Schlüsse und Folgerungen tun, die kurz gefaßt, wie folgt lauten:

Die Tatsache, daß das im Kot abgeschiedene Eisen in keiner Beziehung steht zur Gesamtmenge des Kotes, wird durch vorliegende Untersuchungen aufs neue erhärtet.

Die tägliche Eisenausscheidung bei entmilzten, sonst aber normalen Hunden ist wesentlich größer als bei Hunden mit Milz.

Die größere Ausscheidung findet sich sowohl bei Fleischfütterung, als auch im Hungerzustande, kann





also nicht etwa auf einer schlechteren Nahrungsausnutzung seitens des entmilzten Tieres beruhen.

Die größte tägliche Ausscheidung beim Normaltier betrug 11,20 mg Fe, beim milzlosen 29,22 mg Fe; die niedrigste beim letzteren 16 mg Fe.

Die vermehrte Eisenausscheidung konnte auch 5 Monate nach Entfernung der Milz noch festgestellt werden, wenn auch nicht mehr in so hohem Grade. Sie gehört demnach nicht zu den Erscheinungen, welche etwa nach 4 bis 5 Wochen durch das Eintreten anderer Organe kompensiert werden können.

Auf Grund dieser Resultate muß die Milz als ein Organ des Eisenstoffwechsels angesehen werden. Sie dient unter anderem dazu, Eisen, welches im Stoffwechsel, auch im Hungerstoffwechsel, frei wird, dem Organismus zu erhalten.

Literatur.

L. Asher u. K. Spiro, Ergebnisse der Physiologie, 1. Abt. 1904.

G. Bizzozero, Die Milz als Bildungsstätte roter Blutkörperchen. Centralbl. f. med. Wiss. 1897, 273.

G. von Bunge, Physiologie des Menschen 2, 1905.

A. Dastre, Dératement et croissance. Arch. de physiol. et de pathol. 5, 561.

W. Ellenberger, Handbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere 1, 1906.

A. Gruenhagen, Lehrb. d. Physiol. 1, 1876.

R. Gottlieb, Über die Ausscheidungsverhältnisse des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 1891.

L. Hermann, Handb. d. Physiol. 5, II. Teil, 1881.

H. Nasse, Über den Eisengehalt der Milz. Sitzungsber. d. Ges. z. Beförd. d. ges. Naturw. 1893.

A. Neumann, Einfache Veraschungsmethoden. Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 1902.

A. Pugliese u. Luzzatti, Beitrag zur Physiol. der Milz. Milz und Blutgifte, Arch. per le scienze med. 24.

M. Schiff, Über die Funktion der Milz. Schweizer. Zeitschr. f. Heilkunde 1, 201 und 397.

J Seemann, Die blutbildenden Organe. Ergebn. d. Physiol., 1. Abt. 1904.

Vincent Swale and Harrison, On the Haemolymph. Glands. Journ. of Anat. and Physiol. 31, 176.

Über die Hefenucleinsäure.

Von

P. A. Levene.

(Aus dem Rockefeller Institute for med. Research. New York.)

(Eingegangen am 20. Februar 1909.)

Über die Zusammensetzung der Hefenucleinsäure liegen ältere Arbeiten von Kossel[1]) und die in neuerer Zeit in Schmiedebergs Laboratorium ausgeführten Untersuchungen von Herlant[2]) und Boos[3]) vor.

Nach diesen Untersuchungen unterscheidet sich die Hefenucleinsäure von allen anderen Nucleinsäuren tierischen und pflanzlichen Ursprungs. — Die empirische Formel weicht von der anderer Nucleinsäuren bedeutend ab, wie das aus der folgenden Zusammenstellung ersichtlich ist:

	C	H	N	O	P
Spermanucleinsäure (nach Schmiedeberg[4])	40	56	14	26	4
Thymusnucleinsäure (nach Steudel[5])	40	56	15	26	4
Milznucleinsäure (nach Levene und Mandel[6])	54[7])	71	20	37	5

---

[1]) A. Kossel, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1891, 181; 1893, 159; 1804, 199.

[2]) Herlant, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 44, 159, 1900.

[3]) Boos, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 55, 16—20,1906.

[4]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 57, 309, 1907.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 332, 1905.

[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1905, 1908.

[7]) Sollte es sich herausstellen, daß die komplizierteren tierischen Nucleinsäuren eine Tetraphosphorsäure enthalten, so würde man nicht C_{40}, sondern C_{43} annehmen und die Formel in $C_{43}H_{55}N_5O_{31}P_4$ abändern müssen.

	C	H	N	O	P
Weizenembryonucleinsäure (nach Osborn u. Harris[1])	42	62	16	31	4
Hefenucleinsäure	17	26	6	14	2
(nach Kossel[2])	25	36	9	20	3
(nach Boos[3])	36	52	14	24	4

Auch in der Natur des Kohlenhydrates soll diese Substanz sich von den anderen unterscheiden, da nach Kossel bei der Hydrolyse der Hefenucleinsäure zwei Osazone von den respektiven Schmelzpunkten 204 bis 205 und 150° C sich darstellen lassen. Im Gegensatz hierzu gelingt es nicht, ein Osazon nach der Spaltung der Thymonucleinsäure zu erhalten, und aus der Triticonucleinsäure von Osborn und Harris gelang es nur, eine Pentose zu gewinnen.

Über das Verhältnis der Basen zueinander und über die Anordnung, in welcher die Komponenten miteinander verknüpft sind, liegen keine Angaben vor.

Die vorliegende Untersuchung wurde unternommen, um die Stellung der Hefenucleinsäure zu den anderen Nucleinsäuren aufzuklären. Es stellte sich dabei heraus, daß der Substanz am besten die empirische Formel $C_{38}H_{50}N_{15}P_4O_{29}$ zukommt, und daß sie in ihrer Zusammensetzung mit der Triticonucleinsäure von Osborn und Harris wahrscheinlich identisch ist. Die vier Basen kommen in äquimolekularem Verhältnis vor. Die Substanz enthält scheinbar nur eine Pentose. Es läßt sich bei der alkalischen Hydrolyse, gerade so wie bei der Inosinsäure,[4]) Phosphorsäure abtrennen, ohne eine reduzierende Substanz zu erhalten, man gelangt also zu Komplexen, die aus Zucker und Basen zusammengesetzt sind, welche die Fehlingsche Lösung nicht reduzieren, wohl aber nach Hydrolyse mit Mineralsäuren. Sie sind ziemlich resistent gegen Alkalien, viel empfindlicher gegen Säuren. Sie besitzen also die Eigenschaften von Glucosiden. Außerdem gelang es, bei der Hydrolyse mittels verdünnter Schwefelsäure eine Substanz zu erhalten, die scheinbar einen Komplex Phosphorsäure-Pentose-Uracil darstellte. Auf Grund dieser Befunde kann man sich die Zusammensetzung etwa nach dem folgenden Schema erklären:

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 85, 1902.

[2]) Arch. f. Anat. u. Physiol. 1891, 181.

[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 55, 16—20, 1906.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 2704, 1908.

$$
\begin{array}{l}
\quad\;\; /OH \\
O=P-O\cdot C_5H_8O_3\cdot C_5H_4N_5 \\
\quad\;\; \backslash O \\
\quad\;\; / \\
O=P-O\cdot C_5H_8O_3\cdot C_5H_4N_5O \\
\quad\;\; \backslash O \\
\quad\;\; / \\
O=P-O\cdot C_5H_8O_3\cdot C_4H_5N_3O \\
\quad\;\; \backslash O \\
\quad\;\; / \\
O=P-O\cdot C_5H_8O_3\cdot C_4H_3N_2O_2 \\
\quad\;\; \backslash OH
\end{array}
$$

Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für die Triticonucleinsäure von Osborn und Harris.

Experimenteller Teil.

Darstellung und Eigenschaften. Die Substanz wurde aus einem käuflichen Präparate, das noch biurethaltig war, dargestellt. Zu diesem Zwecke wurde die käufliche Säure mittels ganz wenig Ammoniakwasser aufgelöst und mittels Eisessig gefällt. Ein mäßiger Überschuß von Eisessig hält die Nucleinsäure in Lösung, und nur ein ganz großer Überschuß schlägt sie nieder. So z. B. sind 4 kg Eisessig nötig, um die Substanz aus einer konzentrierten Lösung von 50 g Nucleinsäure zu fällen. Der Niederschlag läßt sich sehr gut über Seide mittels einer Saugpumpe filtrieren. Mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet stellt die Substanz ein schneeweißes Pulver dar. Die Substanz ist auch in Mineralsäuren unlöslich, geht aber bei etwa 24stündigem Stehen mit 2°/₀ Schwefelsäure in Lösung, scheinbar ohne Hydrolyse. Beim Neutralisieren mit Alkalien geht die Lösung nicht in eine Gallerte über, wie das bei der Thymonucleinsäure der Fall ist. Die Substanz ist ziemlich resistent gegen Kochen mit verdünnten Alkalien und empfindlicher gegen Kochen mit Säuren. Sie ist optisch aktiv, und das Drehungsvermögen ändert sich mit der Konzentration der Lauge, in welcher die Substanz aufgelöst ist, wie das W. Jones[1]) für Thymonucleinsäure beobachtet hat.

[1]) W. Jones, Journ. of Biolog. Chem. 5, 1, 1908.

1,0 g der Substanz in 25 ccm 10°/₀igen Ammoniakwassers gelöst, hatte das spezifische Gewicht 0,989 und das Drehungsvermögen von + 1,23° bei 20° und l = 86,5 mm,

$$[a]_D^{20} = + 35,94°.$$

0,5 g der Substanz in 10 ccm 12,5°/₀igen Ammoniakwassers gelöst, hatte das Gesamtgewicht 9,1276 g, spezifisches Gewicht 0,996 und das Drehungsvermögen von + 1,06° = 20° C und l = 50,0 mm.

Mithin $$[a]_D^{20} = + 38,84°.$$

1,0 g der Substanz, in 20 ccm von $^n/_1$-NaOH gelöst, hatte das Gesamtgewicht 20,662 g, das spezifische Gewicht 1,06 und das Drehungsvermögen von + 0,20° bei 20° C und l = 50,0 mm.

Mithin $$[a]_D^{20} = + 7,8°.$$

Die elementare Zusammensetzung der Substanz war folgende:

0,1546 g der Substanz gaben 0,1980 g CO_2 und 0,0642 g H_2O, mithin C = 34,93°/₀, H = 4,30°/₀.

0,1734 g der Substanz gaben 0,2226 g CO_2 und 0,0702 g H_2O, mithin C = 35,01°/₀, H = 4,52°/₀.

0,2162 g der Substanz verbrauchten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 23,5 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, mithin N = 15,21°/₀.

0,6450 g der Substanz gaben beim Schmelzen 0,1987 g $Mg_2P_2O_7$, mithin P = 8,6°/₀.

Für die angenommene Formel $C_{38}H_{50}N_{15}P_4O_{29} + C_2H_4O_2$.

	C	H	N	P
Berechnet	35,18°/₀	4,00°/₀	15,29°/₀	9,08°/₀
Gefunden	34,97°/₀	4,41°/₀	15,21°/₀	8,6°/₀

Purinbasen.

Die Purinbasen waren in mehreren Versuchen dargestellt, obwohl diese nicht alle zum Zwecke der Bestimmung des Verhältnisses dieser Basen unternommen wurden. Man gewinnt aus allen Experimenten den Eindruck, daß die Basen im Moleküle der Nucleinsäure in äquimolekularen Quantitäten vorkommen. Die Ausbeute an Purinbasen betrug in den meisten Experimenten nicht ganz 20°/₀ des Gesamtgewichtes vom Aus-

gangsmaterial, während nach der angenommenen Formel man 21 % erwarten dürfte. Diese Übereinstimmung ist nicht ganz unbefriedigend, wenn man alle möglichen Fehlerquellen, die bei solchen Experimenten vorkommen, in Betracht zieht. Als ein Beispiel sei folgender Versuch erwähnt:

10,0 g der Substanz wurden mit 200,0 ccm 1 % Schwefelsäure 10 Stunden lang im Autoklaven bei 125° C erhitzt. Am Ende der Erhitzung war die Lösung hellbraun und enthielt Spuren von Melanin. Beim Abkühlen schieden sich keine Purinbasen aus, was in den Experimenten der Fall war, in welchen die Verdünnung nicht den Grad dieses Versuches betrug. Zu der kalten Lösung wurde eine Lösung von 15,0 g Silbersulfat in etwa 30 ccm konzentrierter Schwefelsäure zugegeben. Es zeigte sich, daß dann ein Überschuß an Silbersulfat in Lösung war. Die Mischung wurde bei — 1° C 48 Stunden lang stehen gelassen. Der Niederschlag von Silberpurinen wurde dann mittels Salzsäure von Silberpurinen möglichst genau befreit, und aus der Lösung 1,0 g Guanin und 2,0 g Adeninpikrat erhalten.

Zur Identifizierung der Basen wurden sie in größeren Quantitäten dargestellt, so daß mehrmalige Reinigung möglich war. Zu diesem Zwecke wurden 80,0 g der Säure mit einem Liter 2 %ige Schwefelsäure am Rückflußkühler im Ölbade bei 125° C 4 Stunden lang erhitzt. Beim Abkühlen schied sich der größere Teil der Basen aus. Mit dem Filtrate wurde wie im vorigen Experimente verfahren. Die Sulfate der zwei Basen wurden durch Auskochen mit heißem Wasser getrennt, wobei man das unlösliche, freie Guanin bekommt, während Adeninsulfat in Lösung bleibt und beim Eindampfen der Lösung wieder auskrystallisiert. Nach einigem Wiederholen der Operation bekommt man reines Adeninsulfat und reines Guanin. Die Präparate wurden lufttrocken analysiert.

Analyse des Guanins.

0,1752 g der Substanz gaben 0,2544 g CO_2 u. 0,0565 g H_2O.

		C	H
Für $C_5H_5N_5O$	berechnet	39,73 %	3,30 %
	gefunden	39,60 %	3,60 %

Analyse des Adeninsulfats.

0,1856 g der Substanz gaben 0,1986 g CO_2 und 0,0646 g H_2O

		C	H
Für $(C_5H_5N_5)_2H_2SO_4 + 2H_2O$	berechnet	29,70 %	3,96 %,
	gefunden	29,18 %	3,89 %

Pyrimidinbasen.

Schon in früheren Arbeiten von Kossel und Steudel[1]) und von mir[2]) wurde festgestellt, daß zwei Pyrimidinbasen, Uracil und Cytosin, im Moleküle der Hefenucleinsäure vorkommen. Es wurde nun festgestellt, daß das Cytosin zu den Purinbasen in äquimolekularem Verhältnisse vorkommt. Das Uracil konnte nicht in derselben Proportion erhalten werden. Dieses rührt aber von der großen Löslichkeit der Substanz her. Es bleibt aber nichts anderes übrig, als dieses Verhältnis anzunehmen, wenn das der anderen drei Basen erwiesen ist. Die beiden Pyrimidinbasen konnten aus der Nucleinsäure auch nach der Entfernung der Purinbasen erhalten werden.

Für die quantitative Bestimmung der Pyrimidinbasen wurden 10,0 g der lufttrockenen Substanz mit 40 ccm 25 %iger Schwefelsäure 4 Stunden lang im Autoklaven auf 175° C erhitzt. Die resultierende, dunkelbraune Flüssigkeit wurde von Phosphorsäure und Schwefelsäure mittels Barytwasser und von dessen Überschuß mittels Schwefelsäure befreit. Das Filtrat und Waschwasser wurde zu einem kleinen Volumen, etwa auf 200 ccm, bei vermindertem Drucke eingedampft, und heiß mit einer wässerigen Lösung von Pikrinsäure versetzt. Es bildete sich ein flockiger amorpher Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, und das klare Filtrat zu einem kleinen Volumen bei vermindertem Druck eingedampft und der Krystallisation überlassen. Man erhielt auf diese Weise 3,0 g von Roh-Cytosinpikrat, welches bei der Analyse einen Gehalt von C = 32,5 % und H = 2,46 % ergab. Nach zweimaligem Umkrystallisieren erhielt man ein reines Cytosinpikrat.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 51, 1903.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 6, 1903.

0,0980 g der Substanz (bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei 108° getrocknet) gaben 0,1260 g CO_2 und 0,0238 g H_2O

für $C_4H_5N_3O . C_6H_2(NO_2)_3OH$

	C	H
Berechnet	35,29 %	2,35 %,
gefunden	35,06 %	2,58 %

Die Theorie verlangte aus 10,0 g Nucleinsäure eine Ausbeute von etwa 0,8 g Cytosin. Der Befund von 3 g des rohen Cytosinpikrates stimmt mit der verlangten Zahl gut überein.

Die Mutterlauge des Cytosinpikrates wurde von Pikrinsäure befreit und dann mit einer Silbernitratlösung und Barytwasser behandelt. Es bildete sich ein Niederschlag; dieser wurde in Wasser suspendiert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat von Silbersulfid bei vermindertem Druck eingedampft. Beim Stehen bildete sich ein Niederschlag, der mikroskopisch aus Globuliten bestand; er konnte wegen der mangelhaften Ausbeute nicht weiter gereinigt werden.

Die Substanz wurde aber in einem anderen Experimente erhalten und identifiziert. Es wurden nämlich etwa 80,0 g von der käuflichen Nucleinsäure in 1 l 20 %iger Schwefelsäure am Rückflußkühler 4 Stunden lang bei 125° C erhitzt. Aus der Lösung wurden die Purine mittels Silbersulfat entfernt. Ein Teil des Filtrates wurde von Silber und Schwefelsäure befreit, zu einem kleinen Volumen eingedampft, Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 25 % zugesetzt und weiter wie im vorigen Experimente verfahren. Man erhielt dabei reines Uracil.

0,2009 g der Substanz gaben 0,3138 g CO_2 und 0,0656 g H_2O

		C	H
Für $C_4H_4N_2O_2$	berechnet	42,82 %	3,59 %,
	gefunden	42,61 %	3,65 %

Es folgt also, daß auch in dieser Nucleinsäure, wie in der von Osborn und Harris, das Uracil ein primäres Spaltungsprodukt darstellt.

Kohlenhydratgruppe.

Im Gegensatz zu den Nucleinsäuren der tierischen Gewebe läßt sich aus der Hefenucleinsäure leicht ein Kohlenhydrat

abspalten. Schon nach kurzem Erhitzen mittels verdünnten Mineralsäuren bekommt man eine Lösung, welche mit Fehlingscher Lösung einen Niederschlag nicht nur von Purinkupferoxydul, sondern auch von freiem Kupferoxydul bildet. Die Nucleinsäure gibt eine starke, positive Orcinprobe auf Pentose, aber, wie schon Mandel und Neuberg[1]) gefunden haben, eine negative mit Naphthoresorcin. Der leicht abspaltbare Zucker erwies sich als eine Pentose; aber über die genaue Natur des Zuckers kann man sich mit Sicherheit nicht aussprechen. Die Pentose war als Phenylosazon identifiziert. Diese wurde auf folgende Weise erhalten:

80,0 g der käuflichen Nucleinsäure wurden mit 1 l 2%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler im Ölbade 4 Stunden lang auf 125° C erhitzt. Die Purinbasen wurden mittels Silbersulfat entfernt. Aus dem Filtrat hiervon wurden die Zwischenprodukte der Hydrolyse mittels Silber und Barytlösung entfernt und das Filtrat dieses Niederschlages von Silber und Barium befreit. Die so erhaltene Lösung wurde auf 220 ccm eingedampft. 1,5 ccm reduzierten 0,08742 Kupfer, enthielten also etwa 0,052 Zucker; und die totale Ausbeute an Zucker betrug etwa 7,5 g. 80 ccm der ursprünglichen Lösung wurden mit einer Lösung von 10 g Phenylhydrazin in Eisessig auf dem Wasserbade erhitzt. Das Osazon wurde aus wenig Wasser, welches pyridinhaltig war, umkrystallisiert und zur Analyse gebraucht. Es wurde zuerst im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure und dann bei 108° C unter vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd getrocknet. Es hatte einen Schmelzpunkt von 162° C.

0,0688 g der Substanz gaben 0,1578 g CO_2 und 0,0398 g H_2O

für $C_{17}H_{20}N_4O_2$

	C	H
Berechnet	62,20%	6,09%
Gefunden	62,55%	6,47%

0,2000 g der Substanz wurden in einem Gemisch von 6 ccm Alkohol und 4 g Pyridin gelöst. Im 50,0 mm langen Rohre drehte die Lösung —0,42°, Xylosazon sollte —0,12° drehen, Arabinosozon +0,55°. Um den Apparat und die Lösungsmittel zu kontrollieren, wurden reines Xylosazon und Arabinosazon auf ihr Drehungsvermögen untersucht, und man erhielt dabei

[1]) Diese Zeitschr. 13, 151, 1908.

die theoretischen, von Neuberg[1]) angegebenen Zahlen. Es ist nun nicht klar, ob die Abweichung im Drehungsvermögen des vorliegenden Osazones von denen der l-Xylose oder l-Arabinose auf Verunreinigungen beruht. Da nach allen Angaben über die Pentosen der Nucleinsäuren man hier eine l-Xylose erwarten sollte, wurde es versucht, die Xylonsäure zu erhalten. Dieses allein darf aber nicht der Annahme einer Pentose widersprechen, da nach vorliegenden Erfahrungen es nicht gelingt, das Cadmiumsalz bei der Anwesenheit von Spaltungsprodukten der Eiweißkörper und von Nucleinbasen zu erhalten[2]). Auch aus dem Drehungsvermögen der zuckerhaltigen Lösung selbst konnte man nicht mit absoluter Sicherheit auf die Natur der Pentose schließen. So drehte die Lösung, welche nach dem Reduktionsvermögen 1 % Zucker enthielt, im 50 mm-Rohr bei 20° C + 0,07°. Eine l-Xyloselösung von entsprechender Konzentration sollte + 0,09° drehen. Die Lösung enthielt aber noch Spuren von phosphorhaltigen Substanzen, welche einen gewissen Einfluß auf die Drehung des Zuckers ausüben konnten.

Im Gegensatz zu den Angaben von Kossel läßt sich außer der Pentose kein anderer Zucker nachweisen. Bei der Hydrolyse mittels starker Schwefelsäure läßt sich zwar mit Äther eine Substanz ausziehen, die ein Silbersalz bildet, doch war der Silbergehalt des Salzes für Lävulinsäure zu hoch. Die Lävulinsäure nämlich verlangte 48,43 % Ag, während das gefundene Salz 53,40 % Ag enthielt. Dabei war die Ausbeute aus der Substanz sehr gering.

Zur quantitativen Bestimmung der Pentose wurde eine Furfuroldestillation vorgenommen. Das Destillat wurde in zwei Fraktionen aufbewahrt. Die ersten 400 ccm des Destillates stellte die erste Fraktion vor, und die folgenden 200 ccm die zweite. Aus der zweiten Fraktion ließ sich kein Furfurolphloroglucid darstellen. Die Ausbeute an Phloroglucid aus 0,6159 g der Substanz betrug 0,1580 g, was 25 % Xylose entspricht. Berechnet für die angenommene Zusammensetzung der Hefenucleinsäure müßte man etwa 44 % erwarten. Es scheint aber mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden zu sein, bei der Destillation mit Mineralsäuren die berechnete Menge Furfurol

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3384, 1899.

[2]) Neuberg, ibid. 35, 1473, 1902.

aus mit Phosphorsäure gepaarten Pentosen zu erhalten. Auch hinsichtlich der Ausbeute an Furfurol ähnelt die Hefenucleinsäure der aus den Weizenembryonen erhaltenen Substanz von Osborn und Harris.

Alkalische Hydrolyse.

Es sind von Schmiedeberg und Alsberg[1]) bei der Spaltung der Nucleinsäuren mittels Alkalien Komplexe, die scheinbar aus Kohlenhydraten und Basen bestanden, erhalten worden. Neulich ist es Jacobs[2]) und mir gelungen, bei der Spaltung der Inosinsäure das Glucosid Inosin zu erhalten. Da diese Substanzen für die Aufklärung der Nucleinsäuren von großer Wichtigkeit sind, so wurde es versucht, sie aus der Hefenucleinsäure darzustellen. 4,0 g der Substanz waren in wenig Wasser aufgenommen, durch Zusatz von normaler Natronlauge diese Substanz in Lösung gebracht und die Zugabe von Natronlauge fortgesetzt, bis die Lösung gegen Phenolphtalein genau alkalisch geworden war. Die Lösung, welche 22 ccm betrug, wurde in einem Einschmelzrohre 8 Stunden lang auf 125 bis 140° C erhitzt. Es resultierte eine hellbraune Lösung, welche keine freien Purinbasen enthielt, Fehlingsche Lösung nicht reduzierte, aber freie Phosphorsäure enthielt. Das optische Drehungsvermögen war nach dem Erhitzen in diesem Falle stark herabgesetzt. 6 ccm dieser Flüssigkeit wurden mit 20 ccm kaltem, ammoniakhaltigem Wasser in Kältemischung gut abgekühlt, mit Salpetersäure angesäuert, mit Molybdänsäure versetzt und über Nacht bei 1° C stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, unter starkem Abkühlen in Ammoniakwasser gelöst und mit Salpetersäure gefällt. Dieser Niederschlag auf übliche Weise weiter behandelt, betrug 0,0352 $Mg_2P_2O_7$. Mithin wurden aus den 4,0 g Nucleinsäure 0,0323 g, welche etwa 10% der Gesamt-Phosphorsäure entsprechen, abgespalten, ohne die Puringlucoside zu hydrolysieren.

Die Bemühungen, diese Glucoside von den phosphorhaltigen Substanzen zu trennen, haben vorläufig nicht zum Ziele geführt. Die Arbeit in dieser Richtung wird aber fortgesetzt.

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51, 240, 1904.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1909.

Produkte der partiellen Hydrolyse mittels verdünnter Schwefelsäure.

Schmiedeberg und Alsberg[1]) ist es gelungen, bei der Hydrolyse mittels verdünnten Mineralsäuren ein phosphorhaltiges Spaltungsprodukt zu erhalten, welches sie Heminucleinsäure nannten. Ein analoges Produkt haben Osborn und Harris[2]) aus der Triticonucleinsäure erhalten. Und Kossel[3]) erwähnt, daß bei der Hydrolyse mittels verdünnter Mineralsäuren außer den Purinbasen noch eine phosphorhaltige Substanz entsteht. Vor einiger Zeit ist es Mandel und mir[4]) gelungen, bei der Hydrolyse der Thymonucleinsäure eine Substanz zu erhalten, welche die Zusammensetzung eines Komplexes Thymoglucophosphorsäure besaß. Es wurde nun versucht, auf ähnliche Weise ein analoges Produkt aus der Hefenucleinsäure zu gewinnen. Es wurde dazu auf folgende Weise verfahren: 80,0 g der käuflichen Nucleinsäure wurden mit einem Liter 2%iger Schwefelsäure am Rückflußkühler 4 Stunden im Ölbade auf 125° C erhitzt. Beim Abkühlen schieden sich die Sulfate der Purinbasen aus. Zum Filtrat wird ein Überschuß von einer Lösung von Silbersulfat in verdünnter Schwefelsäure hinzugesetzt. Man bedarf etwa 100,0 g Silbersulfat. Es wurde über Nacht stehen gelassen, um eine möglichst vollständige Ausscheidung von Silberpurinen zu erhalten. Zum Filtrat von diesen fügt man eine konzentrierte Barytwasserlösung, bis zur alkalischen Reaktion. Der auf diese Weise entstandene Niederschlag wird in 2%iger Schwefelsäure aufgenommen, vom Silber mittels Schwefelwasserstoff befreit, dann mit Bariumcarbonat aufgekocht und das Filtrat bei vermindertem Drucke zu ganz kleinem Volumen eingedampft. Die Lösung wurde mit Alkohol gefällt, der Niederschlag in Wasser gelöst und mit Alkohol umgefällt.

Die Substanz wurde im Vakuumexsiccator und dann bei vermindertem Druck über Phosphorpentoxyd bei 180° C getrocknet. Sie hatte die folgende Zusammensetzung:

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51, 240, 1904.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 113, 1402.
[3]) Arch. f. Anat. u. Physiol. 1891, 185.
[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 1905, 1908.

0,3210 g der Substanz gaben 0,2060 g CO_2 und 0,0866 g H_2O; C = 17,51 %; H = 3,07 %.

0,3271 g der Substanz verbrauchten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 0,110 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, mithin N = 4,70 %.

0,4819 g der Substanz gaben 0,2864 g $BaSO_4$; Ba = 34,35 %.

0,5510 g der Substanz gaben 0,0814 g $Mg_2P_2O_7$; P = 4,41 %.

Für das basische Bariumsalz des Komplexes wurde verlangt:

C	H	N	P	Ba
17,64	1,96	4,57	5,06	44,70
17,57	3,07	4,70	4,41	

Die Substanz gab eine positive Orcinprobe, und bei der Destillation mittels Salzsäure vom spez. Gew. 1,06 lieferte sie Furfurol.

5,0 g dieser Substanz wurden in einem Einschmelzrohre 4 Stunden lang im Ölbade auf 150° C erhitzt. Die Flüssigkeit mit Äther extrahiert, die Schwefelsäure mit Barytwasser und der Überschuß an Baryt mittels Kohlensäure entfernt. Die eingedampften Filtrate wurden mit wässeriger Pikrinsäurelösung behandelt, doch bildete sich kein Cytosinpikrat.

Die Pikrinsäure wurde darauf in der üblichen Weise entfernt und dann die Flüssigkeit mit einer Lösung von Silbernitrat und Barytwasser, behandelt. Es bildete sich ein Niederschlag, aus welchem man eine Substanz vom Aussehen des Uracils erhielt. Die Ausbeute reichte aber zur Analyse nicht aus. Aus dem ätherischen Auszuge ließ sich wieder eine Substanz mit einem Gehalt von 53,30 % Ag darstellen.

Auf Grund der analytischen Zahlen kann man kaum die Substanz als einen einheitlichen Körper betrachten, doch ist das Verhältnis von P : N : C dem von einem Komplex, welcher aus Phosphorsäure, Pentose und Uracil besteht, ähnlich. Bei solch einem Komplex würde P : N : C = 1 : 0,9 : 3,9 sein, bei der vorliegenden ist P : N : C = 1 : 1,06 : 3,7.

Die Resultate der Spaltung mittels 25 %iger Schwefelsäure scheinen diese Ansicht über die Natur der Substanz zu stützen.

Zur Kenntnis der Zuckerspaltungen.

Dritte Mitteilung.

Die Elektrolyse des Traubenzuckers.

Von

Walther Löb.

(Aus der biochemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 9. März 1909.)

Die Abbaureaktionen der Zuckerarten sind für biologische Vorgänge nach zwei Richtungen von besonderem Interesse, erstens bezüglich ihres Ablaufs bei Fehlen von Oxydationsmitteln, dann in ihrer Gegenwart. Während jene über die anaeroben Zuckerspaltungen, wie sie die Gärungserscheinungen bieten, und die zu ihnen gehörenden oder ihnen nahestehenden intramolekularen Prozesse Aufklärung bringen können, stehen die letzteren in nahem Zusammenhange mit den biologischen Oxydationserscheinungen, denen das Zuckermolekül unterliegt. Daß die Zuckerspaltung oder die intramolekulare Oxydation in enger Beziehung zur Zuckerverbrennung steht, ist aus der Fähigkeit der ersteren, die letztere in lebenden Organen der Tier- und Pflanzenwelt zu ersetzen oder an ihre Stelle zu treten, ohne weiteres zu erkennen. Zur Aufklärung des chemischen Verhältnisses der beiden Reaktionsformen zueinander ist es wichtig, festzustellen, ob die ohne Mitwirkung des Sauerstoffs eintretenden Zuckerspaltungen auch die Oxydationsvorgänge einleiten, so daß ein primär sich gleichbleibender Vorgang nach verschiedenen Richtungen abgelenkt wird, je nachdem eine Verbrennung intramolekular oder durch Sauerstoffzufuhr stattfindet.

Zur Prüfung der von mir schon früher vertretenen Ansicht,[1]) daß Zuckeraufbau und Zuckerabbau nicht nur biologisch, sondern auch chemisch umkehrbare Prozesse vorstellen, habe ich es mir zur Aufgabe gesetzt, die chemische Untersuchung von diesen Gesichtspunkten aus durchzuführen.

Es handelt sich dabei um die Annahme, daß der Zucker, wie er durch einen Polymerisationsvorgang aus Formaldehyd, vielleicht im sukzessiven Aufbau über Diosen, Triosen usw. bis zu den Hexosen, entsteht, so auch durch Depolymerisation wieder unter Aufhebung der Aldolbindungen vielleicht durch eine Art hydrolytischer Spaltung zerfällt.

Wenn nun in einen solchen Zerfall das Energiebedürfnis eines lebenden Organismus eingreift, so kann dasselbe nur durch Vorgänge befriedigt werden, die in Gegenwart von Sauerstoff die durch den Zerfall geschaffenen Molekülarten — im einfachsten Falle CH_2O — verbrennen, bei seinem Fehlen als intramolekulare Oxydationen, Umlagerungen und Synthesen unter positiver Wärmetönung der Gesamtreaktion verlaufen.

In dem natürlichen Zuckeraufbau durch die Pflanzen führt der Weg der Synthese zweifellos über die reduzierte Kohlensäure, nach v. Bayers bekannter Hypothese, die durch meine[2]) Versuche über die Zuckerbildung aus Kohlensäure und Wasser unter dem Einflusse der stillen Entladung sowie durch Fentons[3]) Versuche über die Reduktion der Kohlensäure im Lichte experimentell genügend gestützt ist, über Formaldehyd. Dabei ist es zunächst unentschieden, ob der Formaldehyd als solcher oder in Bindung an Eiweiß oder in einer tautomeren Form als schnell vergängliche Zwischenphase auftritt. Die Zuckersynthese aus Formaldehyd erscheint als eine endotherme Polymerisation, deren Umkehrung mithin eine exotherme Depolymerisation des Zuckers wäre.

Das experimentelle Problem, das aus diesen Überlegungen hervorgeht, besteht in erster Linie in der Feststellung der Bedingungen, unter denen ein Zucker zu Formaldehyd depolymerisiert wird.

Eine Reihe von Tatsachen, teils rein chemischen, teils bio-

[1]) Diese Zeitschr. 12, 78, 1908 u. a. a. O.
[2]) Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282, 1906.
[3]) Journ. Chem. Soc. 91, 687, 1907.

chemischen, hat einen solchen Zuckerabbau unter manchen Verhältnissen wahrscheinlich gemacht, jedoch nicht bewiesen. Zu den chemischen Erfahrungen gehört das Auftreten von Ameisensäure[1]) bei der Oxydation der Zuckerarten, die Imidazolbildung[2]) aus Zucker und Ammoniak, die Entstehung einer Pentose aus Glykolaldehyd[3]) u. a. m. Jedoch sind diese Versuche nicht eindeutig, weil in ihnen nur aus der Bildung anderer Stoffe auf die Mitwirkung oder vorübergehende Gegenwart von Formaldehyd geschlossen werden kann. Von biochemischen Tatsachen ist die Beobachtung von Lebedew[4]) über das Auftreten von Formaldehyd bei der zellfreien Zuckergärung zu erwähnen, sowie der von Bokorny[5]) gelieferte Nachweis der Assimilation des Formaldehyds zu Stärke in der lebenden Pflanze. Vor kurzem hat Jensen[6]) — freilich nur vorläufig — mitgeteilt, daß ihm die Isolierung des Dioxyacetons als sicheren Zwischenproduktes der alkoholischen Gärung gelungen sei. Jedoch fehlt den bisher veröffentlichten Angaben die Beweiskraft. Einerseits wird wieder die Vergärbarkeit des Dioxyacetons, die nach Emmerlings[7]) sorgfältigen Versuchen nicht besteht, behauptet, andrerseits ist die Notwendigkeit, zur Dioxyacetonanreicherung durch Hefegärung den Zucker in Glycerin zu lösen, recht bedenklich. Bekanntlich findet nach den Versuchen Bertrands[8]) und Berthelots[9]) durch Enzym- oder Bakterienwirkung leicht eine Oxydation des Glycerins zu Dioxyaceton statt, und die Bedingungen für eine solche Bildung scheinen in den Jensenschen Versuchen nicht ausgeschlossen. Dem Auftreten sehr geringer Mengen von Dioxyaceton bei der gewöhnlichen alkoholischen Gärung, wie sie Jensen beobachtet hat, kann eine Bedeutung zur endgültigen Entscheidung der Frage, welche

---

[1]) Buchner, Meisenheimer u. Schade, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. 39, 4217, 1906.

[2]) Windaus u. Knoop, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 1166, 1905.

[3]) Neuberg, diese Zeitschr. 12, 337, 1908.

[4]) Diese Zeitschr. 10, 454, 1908.

[5]) Pflügers Archiv d. Physiol. 125, 467, 1908.

[6]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 26a, 666, 1908.

[7]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 544, 1899.

[8]) Compt. rend. 126, 842, 984, 1898.

[9]) Annal. de Chim. et de Phys. [3] 50, 369, 1857; vgl. Compt. rend. 133, 887, 1901.

Stoffe Zwischenprodukte, welche Nebenprodukte der Gärung sind, nicht zuerkannt werden.

Mir kam es darauf an, festzustellen, ob zunächst rein chemisch in einwandfreier Weise Formaldehyd aus Zucker gewonnen werden kann unter Bedingungen, die einen Einblick in den Mechanismus der Reaktion gestatten. Meine ersten Versuche[1]) mit Zinkcarbonat, Zinkstaub und Eisen hatten in dieser Richtung nicht den gewünschten Erfolg. Sie bewiesen nur, daß Formaldehyd und Zucker die gleichen flüchtigen Substanzen, Acetol und Methylketol, liefern; gleichzeitig machten sie es sehr wahrscheinlich, daß der Formaldehyd zuerst Zucker bildet, der dieselben Zersetzungen erleidet, wie der bei den Parallelversuchen gewählte Traubenzucker. Die Versuche weisen deutlich auf die Schwierigkeiten der experimentellen Aufgabe hin: erstens unterliegt der Formaldehyd im Reaktionszustande äußerst leicht der Zuckersynthese, zweitens ist das Zuckermolekül so empfindlich, daß es selbst durch milde Agentien weitgehenden Zersetzungen ausgesetzt ist. Ist aber die Zuckersynthese aus Formaldehyd ein unter den Versuchsbedingungen umkehrbarer Vorgang, so handelt es sich nicht um irgendwelche Zersetzungen des Zuckermoleküls, sondern um Eingriffe in Gleichgewichtsverhältnisse und Reaktionsgeschwindigkeiten. Dem Versuche, durch solche Eingriffe einen Einblick in die einfachsten Formen der Zuckerspaltung zu erhalten, dienen die folgenden Arbeiten. Sie umfassen:

I. Die Elektrolyse des Traubenzuckers.
II. Die Elektrolyse des Glycerins.
III. Die Elektrolyse des Glykols.
IV. Versuche der Umkehrung der Zuckersynthese aus Formaldehyd.

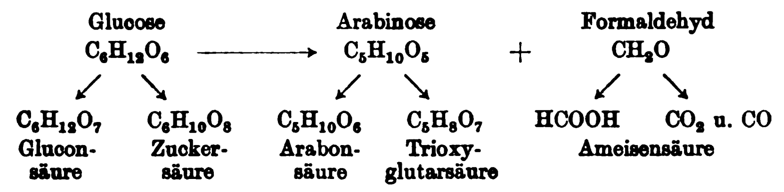
Die beiden letztgenannten Elektrolysen sind in Gemeinschaft mit Dr. G. Pulvermacher ausgeführt worden.

Die vorliegende Abhandlung beschäftigt sich mit der Elektrolyse des Traubenzuckers.

Unterwirft man eine Lösung von Traubenzucker in verdünnter Schwefelsäure unter Vermeidung von Temperaturerhöhung an einer Bleianode der Einwirkung des elektrischen

[1]) Diese Zeitschr. 12, 78, 1908.

Stromes, so verläuft die Elektrolyse in Gegenwart eines Überschusses an Traubenzucker nahezu ohne anodische Gasentwicklung, die bei Wahl entsprechender Stromverhältnisse überhaupt erst nach längerer Durchführung des Versuches in sehr geringem Umfange auftritt. In der Lösung aber findet sich außer nicht verbrauchter Glucose: Formaldehyd, Ameisensäure, d-Arabinose, d-Arabonsäure bzw. Trioxyglutarsäure, Gluconsäure bzw. Zuckersäure. Andere Produkte, wie Glycerinaldehyd, Dioxyaceton, Milchsäure lassen sich nicht nachweisen. Von den möglichen Auffassungen über die Entstehung dieser Produkte ist die folgende gewählt:[1])



Als primären Prozeß betrachte ich also den Zerfall des Traubenzuckers, als sekundären die Oxydation zu den Säuren.

Experimenteller Teil.

Die Elektrolyse des Traubenzuckers ist von einer Reihe von Forschern mit verschiedenen Ergebnissen ausgeführt worden. O'Brien Gunn[2]) erhielt Mannit, Brown[3]) Kohlenoxyd, Kohlensäure, Acetaldehyd, Ameisensäure, Essigsäure, Berthelot[4]) gibt an, Alkohol beobachtet zu haben, Gladstone und Tribe[5]) wiesen eine Jodoform liefernde Substanz nach, Maumené[6]) erwähnt die Bildung von Milchsäure. Die gründlichsten Versuche rühren von Renard[7]) her, der durch die Wirkung des Stromes auf eine schwefelsaure Lösung von Glucose an Platinanoden Kohlenoxyd, Kohlensäure, Ameisensäure, Trioxymethylen und

---

[1]) Die theoretische Begründung dieser Ansicht soll demnächst nach Darlegung des experimentellen Materials gebracht werden.

[2]) D. R. P. Nr. 140318 (1900).

[3]) Chem. News 25, 249.

[4]) Compt. rend. 87, 949, 1881.

[5]) Chem. News 47, 277.

[6]) Compt. rend. 101, 1156, 1895.

[7]) Ann. de Chim. et de Phys. [5], 17, 289, 1879.

Zuckersäure gewann. Das Trioxymethylen wurde durch Eindunsten des Destillates über Schwefelsäure gummiartig erhalten. Irgendeine Zuckerart — außer Glucose — hat Renard nicht beobachtet. Schließlich sind hier noch die interessanten Versuche Neubergs[1]) über die Elektrolyse von Säuren der Zuckergruppe zu erwähnen. Obgleich die Elektrolyse der Gluconsäure, wie die der Glucose, unter einer Verkürzung der Kohlenstoffkette zu einer Pentose führen, halte ich die beiden Vorgänge für wesentlich verschieden. Bei dem Traubenzucker handelt es sich um die Wirkung des anodischen Sauerstoffs auf einen als Depolarisator fungierenden Nichtelektrolyten, bei der Gluconsäure um eine Reaktion der entladenen Säureanionen. Letztere können aber, obgleich etwas Gluconsäure bei der Elektrolyse des Traubenzuckers entsteht, in Gegenwart der die Stromleitung besorgenden und die Dissoziation jeder anderen Säure herabsetzenden Schwefelsäure in meinen Versuchen nicht zur Wirkung kommen.

Ich führte die Elektrolyse des Traubenzuckers nach einer Reihe von Vorversuchen in folgender Weise aus.

10 bis 30 g reinste Glucose (Kahlbaum) werden in 25 ccm Wasser gelöst; nach dem Erkalten fügt man 25 ccm 10%ige Schwefelsäure hinzu und bringt die Flüssigkeit in einen etwa 100 ccm fassenden, sorgfältig gereinigten Tonzylinder, der mit einem mehrfach durchbohrten Gummipfropfen dicht verschlossen ist. Zwei Durchbohrungen dienen der Durchführung der als Anode dienenden Bleischlange, welche während der ganzen Dauer des Versuchs von kaltem Wasser durchströmt wird, so daß die Temperatur der Anodenflüssigkeit nicht über 16° steigt. Eine dritte Durchbohrung nimmt ein gebogenes Glasrohr auf, durch das die während der Elektrolyse entwickelten Gase in ein Azotometer zur Messung und Analyse geleitet werden. Der Tonzylinder befindet sich in einem weiteren Becherglas, das bis zur Niveauhöhe der Flüssigkeit im Innern des Tonzylinders mit 5%iger Schwefelsäure beschickt wird und die aus einem runden Platinblech von 5 cm Durchmesser bestehende Kathode aufnimmt.

Die als Anode dienende Bleischlange besitzt eine wirksame

---

[1]) Diese Zeitschr. 7, 527, 1908.

Oberfläche von etwa 20 qcm, die vor Beginn der Versuche sorgfältig nach Tafels[1]) Vorschrift gereinigt werden muß.

Da die Versuche in der Weise durchgeführt werden sollten, daß Glucose gegenüber dem Sauerstoff stets im Überschuß blieb, wurde meist auf ein Molekül Zucker nur ein Atom Sauerstoff zur Wirkung gebracht. Eine Ampère-Stunde liefert 0,29 g Sauerstoff; es kommen also für 10 g Zucker 3,1 Ampère-Stunden = 0,9 g Sauerstoff zur Verwendung. Bei einer durchschnittlichen Stromstärke von 1 Amp. dauert mithin ein Versuch mit 20 g Zucker rund $6^1/_4$ Stunden. Nach dieser Zeit ist aber noch so viel Glucose unangegriffen, daß mehrere Versuche längere Zeit durchgeführt wurden. Immer aber ist nach beendigter Elektrolyse die Flüssigkeit wasserklar und enthält nur einen geringen weißen Bodensatz von Bleisulfat, das auch die Anode mit einem dünnen Überzug bedeckt. Darunter liegt meist eine feine braune Haut von Bleisuperoxyd.

Der Gang der Bearbeitung war der folgende. Da an flüchtigen Produkten außer Formaldehyd auch Ameisensäure entsteht, diese beiden Substanzen aber getrennt werden müssen, und da außerdem eine Destillation aus schwefelsaurer Lösung sekundäre Reaktionen veranlassen kann, so wird zunächst die vom Bleisulfat filtrierte Lösung in der Kälte mit Calciumcarbonat neutralisiert, von dem Überschuß des letzteren und dem ausgeschiedenen Calciumsulfat filtriert und das neutrale Filtrat der Destillation mit Wasserdampf unterworfen. Es geht hierbei ein neutrales Destillat über, das Formaldehyd und etwaige andere flüchtige neutrale Substanzen enthält. Bei der Schwerflüchtigkeit des Formaldehyds müssen $1^1/_2$ bis 3 l Destillat hergestellt werden.

Der Destillationsrückstand wird nun zur Gewinnung der Ameisensäure mit Oxalsäure angesäuert und abermals der Dampfdestillation unterworfen, bis das Destillat — 1 bis 3 l — keine saure Reaktion mehr zeigt.

Der nunmehr verbleibende Destillationsrückstand wird in der Kälte mit Calciumcarbonat wieder neutralisiert, nach längerem Stehen von diesem und dem oxalsauren Calcium filtriert und das klare, kaum gefärbte Filtrat im Vakuum bei 45° bis 50° Badtemperatur vollständig zur Trockne gebracht.

---

[1]) Zeitschr. f. phys. Chem. 34. 187, 1900.

Es bleibt ein Sirup, der aus Zuckerarten und den Calciumsalzen nicht flüchtiger Säuren besteht, zurück. Zur Scheidung des Gemisches wird der Sirup zunächst zweimal mit je 200 ccm absoluten, dann ebenso oft mit den gleichen Mengen 90%igen Alkohols ausgekocht. Die alkoholischen Lösungen enthalten die Zuckerarten, fast frei von Calciumsalzen.

Die in Alkohol unlöslichen Calciumsalze können durch Lösen in wenig Wasser und Filtration in einen großen Überschuß von Alkohol in fester Form, durch mehrmalige Wiederholung der Operation, eventuell mit Hilfe von Tierkohle, rein weiß gewonnen werden. Man trocknet die Calciumsalze nach dem Auswaschen mit Alkohol und Äther zweckmäßig erst im Vakuum, dann im Toluolbad bis zur Gewichtskonstanz.

Die Bearbeitung und Bestimmung der einzelnen Fraktionen wird in folgender Weise ausgeführt.

Dem Nachweis des Formaldehyds im ersten Destillat dient eine Reihe von Reaktionen; die Lebbinsche[1]) Resorcinprobe, die äußerst empfindliche Pilhashysche[2]) Phenylhydrazin-Schwefelsäurereaktion, die Phenylhydrazin-Eisenchloridfärbung[3]), die Nitroprussidnatrium-Phenylhydrazinreaktion von Rimini[4]), die Phloroglucinprobe von Jorissen[5]) und das Methylendiphenyldihydrazon nach Neuberg[6]). Diese Reaktionen besitzen einen verschiedenen Grad von Empfindlichkeit, so daß bei sehr geringer Formaldehydkonzentration nicht alle positiv ausfallen. Jedoch lassen sich auch in diesen Fällen, die bei der Traubenzuckerelektrolyse aber nicht auftreten, durch Kontrollreaktionen mit reinem Wasser und Formaldehydlösungen von steigender Verdünnung eindeutige Resultate erzielen.

Die quantitative Formaldehydbestimmung wird mittels der Jodtitrationsmethode nach Romijn[7]) ausgeführt, die nur dann im Stiche läßt, wenn Jodoform liefernde Substanzen im ersten

---

[1]) Zeitschr. d. allgem. österr. Apoth.-Ver. 51, 42.

[2]) Fresenius. Zeitschr. 41, 50, 1902.

[3]) Arnold und Mentzel, Zeitschr. f. Unters. Nahr.- u. Genußm. 5, 353, 1902.

[4]) Chem. Centralbl. 1898, I, 1152; 1902, I, 1076. — Chem.-Zeitg. 26, 246, 1902.

[5]) Journ. Pharm. Chim. 1897, 167.

[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 1961, 1899.

[7]) Fresenius. Zeitschr. 36, 18, 1897.

Destillat zugegen sind. Als solche kommen nur Acetol und Methylketol in Frage, deren Gegenwart durch die Bildung der ersten, schwerlöslichen Osazone leicht erkennbar ist. Sie entstehen nicht, wenn man die Elektrolyse unter Kühlung in der vorgeschriebenen Weise durchführt. Es ist aber möglich, daß die von anderen Forschern erhaltene Jodoform gebende Substanz, die als Alkohol angesprochen wurde, einer der Körper oder ein Gemisch beider war.

Nachdem durch die Analyse des Barium- und Bleisalzes und ihre Eigenschaften als einzige flüchtige Säure im zweiten Dampfdestillat die Ameisensäure erkannt war, ließ sich ihre Menge durch Titration gegen $^{n}/_{10}$-Natronlauge ermitteln.

Die Gewichte der Rückstände aus den alkoholischen Auszügen des im Vakuum enthaltenen Sirups wurden nach dem Trocknen im Vakuumexsiccator festgestellt. Der absolut-alkoholische Auszug enthält vorwiegend unveränderte Glucose, zeigt aber bereits schwach, doch unverkennbar die Bialsche Pentosenreaktion, welche weit schärfer durch den Rückstand der Extraktion mit $90^{0}/_{0}$igem Alkohol hervorgerufen wird.

Die Gegenwart der Glucose läßt sich durch das Gärungsvermögen mit Hefe und die Darstellung des Glucosazons leicht nachweisen. Die Pentose wird durch die Bialsche Orcinreaktion oder die Phloroglucinreaktion qualitativ leicht erkannt. Auch gelingt es, das Pentosazon, das sich durch Schmelzpunkt und Analyse als d-Arabinosazon charakterisierte, durch mehrfaches Umkrystallisieren aus wenig heißem Wasser vom Glucosazon zu trennen. Der Schmelzpunkt wurde nach dreimaliger Krystallisation bei 164° bis 166° gefunden.

Die Stickstoffbestimmung ergab folgende Werte:

0,1033 g Substanz = 16,17 ccm N bei 22,5° und 756 mm Hg;
$N = 17{,}6^{0}/_{0}$. Berechnet: $17{,}18^{0}/_{0}$.

Gelegentlich wurde auch das p-Bromphenylhydrazon vom Schmelzpunkt 163° dargestellt.[1])

Besser gelingt die Trennung der d-Arabinose vom Traubenzucker nach der Vorschrift von Ruff[2]) mittels des Benzylphenylhydrazins. Das Arabinosebenzylphenylhydrazon zeigte

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 31, 1573, 1898.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3234, 3672, 1899.

in Übereinstimmung mit Ruffs Angaben den Schmelzpunkt 174°.[1])

Die quantitative Bestimmung der Pentosen läßt sich mit genügender Genauigkeit nach der Methode von Tollens durch Überführung in Furfurol und dessen Kondensation mit Phloroglucin ausführen. Auch das p-Nitrophenylhydrazon des Furfurols[2]) (127°) wurde dargestellt. Außer Arabinose und d-Glucose entstehen innerhalb der gewählten Versuchsdauer keine Zucker. Besonders erwähnt sei, daß alle Versuche, Glycerinaldehyd durch Phloroglucin und Dioxyaceton durch Methylphenylhydrazin nachzuweisen, fehlschlugen.

Bei den Calciumsalzen der nicht flüchtigen Säuren mußte ich mich wegen der Unmöglichkeit, die freien Säuren zu isolieren, auf Calciumbestimmungen beschränken. Diese sowie ihre Eigenschaften lassen keinen Zweifel, daß Polyoxysäuren der C_5- und C_6-Reihe entstehen, bald die eine überwiegend, bald die andere.

Bei länger durchgeführten Elektrolysen entsteht die auch von Renard beobachtete Zuckersäure, die durch die charakteristischen Eigenschaften des schwer löslichen sauren Kaliumsalzes leicht nachweisbar ist.

Die Polyoxysäuren, deren Bildung bei der Zersetzung des Zuckers in Gegenwart von Hydroxylionen auf intramolekularer Oxydation[3]) beruht, entstehen hier durch direkte Oxydation durch den an der Anode verfügbaren Sauerstoff.

Daß die Gasentwicklung bei der Zuckerelektrolyse an einer Bleianode — in Gegensatz zu der an einer Platinanode — äußerst geringfügig ist, wurde schon erwähnt. In einem sechsstündigen Versuche entstanden z. B. im ganzen 29,2 ccm Gas, die sich erst nach der dritten Ampère-Stunde zu entwickeln

---

[1]) Es sei hier beiläufig bemerkt, daß die Darstellung des Benzylphenylhydrazins großer Vorsicht bedarf, vor allem vollständig reiner Reagentien und guter Abkühlung bei ihrer Mischung. Nur das reine Hydrazin eignet sich zur Trennung der Arabinose von anderen Zuckern.

Trotz genauer Befolgung der Literaturvorschriften mißglückte mehrmals die Darstellung des Benzylphenylhydrazins ohne ersichtlichen Grund. Auch Herr Ruff selbst hat, wie er mir auf meine Anfrage brieflich mitteilte, die Schwierigkeiten in der Darstellung des Hydrazins nach der Vorschrift von Minunni beobachtet.

[2]) Feist, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 2098, 1900.

[3]) Diese Zeitschr. 12, 96, 1908.

begannen. Sie enthielten 20,4 ccm CO_2 und 2,4 ccm CO. Diese geringen Oxydationen der Ameisensäure oder des Formaldehyds sind für die Interpretation der Versuche natürlich bedeutungslos.

Ich gebe nun die Resultate einiger Versuche und stelle zur Beurteilung des Gemisches der Polyoxysäuren die Gehalte an Calcium für die in Frage kommenden Säuren zusammen.

Zuckersaures	Calcium	neutral .	Ca = 16,16 %
„	„	sauer . .	„ = 8,75 %
Gluconsaures	„	. . . . .	„ = 9,32 %
Trioxyglutarsaures	„	neutral .	„ = 18,39 %
Arabonsaures	„	. . . . .	„ = 10,83 %
Erythronsaures	„	. . . . .	„ = 12,93 %

Die Calciumsalze der nicht flüchtigen Säuren wurden, wie erwähnt, durch mehrfache Umfällung aus Alkohol gereinigt. Sie waren nach dem Trocknen bei 112° bis zur Gewichtskonstanz wasserfrei.

Die Zusammenstellung der gefundenen Werte mit den aufgewandten Ampèrestunden zeigt, daß die Oxydation zuerst nur bis zu den einbasischen Säuren geht, daß aber bei weiterer Durchführung der Elektrolyse die Entstehung von Säuren eintritt, deren Salze einen höheren Calciumgehalt besitzen.

Amp.-Std. für 20 g Glucose	5,5	7	20	48
Ca-Gehalt	10,59 %	12,78 %	15,64 %	18,35 %

Die Zahlen weisen darauf hin, daß Gemische der oben genannten Säuren vorliegen, wenn auch bei der geringen Ausbeute eine sichere Entscheidung über diese für das vorliegende Problem nicht ausschlaggebenden Verhältnisse unmöglich war. Das aber erscheint unverkennbar, daß bei fortschreitender Oxydation die zweibasischen Säuren, Zuckersäure und Trioxyglutarsäure, neben den einbasischen auftreten und schließlich ins Übergewicht kommen. Das Bild des Zuckerabbaues, das sich bei der elektrolytischen Oxydation ergibt, ist das folgende.

Der Traubenzucker erleidet einen Zerfall in d-Arabinose und Formaldehyd; diese sowie das Ausgangsmaterial unterliegen der fortschreitenden Oxydation. Aus dem letzteren entsteht

Gluconsäure und Zuckersäure, aus dem Formaldehyd wird Ameisensäure, bzw. Kohlenoxyd und Kohlensäure; d-Arabinose liefert Arabonsäure und Trioxyglutarsäure. Die Ausbeute an den Aldehyden zu verbessern, gelingt nicht, weil bei längerer Dauer der Elektrolyse die Säuren auf Kosten der schon gebildeten Aldehyde zunehmen. Das zeigt sich daran, daß das Gewicht des alkohollöslichen Zuckersirups mit der Zeit abnimmt, das der Calciumsalze der Säuren entsprechend steigt.

Amp.-Stunden	5,5	20	48
Gewicht des Zuckersirups	6,9 g	3,5 g	0,8 g
Gewicht der Ca-Salze der nicht flüchtigen Säuren	1,2 g	3,1 g	4,2 g

Bei dem letzten Versuch war die Ameisensäure fast vollständig oxydiert worden; die Analyse der Calciumsalze (18,3 % Ca) wies darauf hin, daß die Dicarbonsäuren vorwiegend entstanden waren.

Über die Ausbeuten an Formaldehyd, Arabinose und Ameisensäure gibt die folgende Tabelle Aufschluß:

Nr.	Zusammensetzung der Anodenlösung	Stromverhältnisse	Formaldehyd g	Arabinose g	Ameisensäure g
1	20 g Glucose, 50 ccm 5 %ige Schwefelsäure	Intens.: 1 Amp. Dauer: 4,5 Ampstd.	0,106	0,220	0,808
2	"	Intens.: 1 Amp. Dauer: 6 Ampstd.	0,226	0,180	—
3	"	Intens.: 1 Amp. Dauer: 7 Ampstd.	0,15	Als Arabinosebenzylphenylhydrazin isoliert	0,80
4	"	Intens.: 1 Amp. Dauer: 14,4 Ampstd.	0,25	Als Bromphenylosazon isoliert	1,66
5	"	Intens.: 1 Amp. Dauer: 20,7 Ampstd.	1,42	0,230	2,3
6	"	Intens.: 1 Amp. Dauer: 48 Ampstd.	0,10	Sehr wenig	—

Die Potentialdifferenz betrug bei allen Versuchen 4 bis 5 Volt, meist etwa 4 Volt. Bei den gleichbleibenden Elektroden- und Lösungsverhältnissen genügte die Einstellung der gleichen Stromdichte, um für die Anodenpotentiale konstante Verhältnisse zu schaffen. Die Versuchsspannung selbst ist bei dem Einfluß der wechselnden Widerstände der Tonzylinder ohne Bedeutung und deshalb im einzelnen nicht angegeben.

Über Ureidoglucose.

Von

Paul Mayer, Karlsbad.

(Aus der chemischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 1. März 1909.)

Vor einigen Jahren hat M. N. Schoorl[1]) festgestellt, daß Traubenzucker und Harnstoff sich unter bestimmten Bedingungen miteinander verbinden. Wenn man die Glucose und Harnstoff in saurer Lösung längere Zeit stehen läßt, nimmt das dextrogyre Rotationsvermögen der Flüssigkeit allmählich ab und geht schließlich in eine Linksdrehung über. Die Verbindung der beiden Substanzen erfolgt am raschesten und vollständigsten bei einer Temperatur von 50° und bei starker Konzentration und vollzieht sich nach folgender Gleichung:

$$\begin{array}{l} CO \\ | \\ HCOH \\ | \\ OHCH \\ | \\ HCOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} + NH_2{-}CO{\cdot}NH_2 = H_2O + \begin{array}{l} CH{:}N{-}CO{-}NH_2 \\ | \\ HCOH \\ | \\ OHCH \\ | \\ HCOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

Durch Kochen der verdünnten Lösungen mit Mineralsäuren wird die Ureidoglucose in ihre Komponenten zerlegt, und dementsprechend vereinigen sich Harnstoff und Traubenzucker in verdünnten Lösungen nicht vollständig sondern nur bis zum

[1]) M. N. Schoorl, Les uréides (carbamides) des sucres. Rec. d. trav. chim. d. Pays-Bas et de la Belgique, 22, 1, 1903.

Eintritte eines Gleichgewichtszustandes zwischen Ureidoglucose und ihren Zerfallsprodukten.

Die Ureidoglucose lenkt die Polarisationsebene nach links ab, und hat eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D = -23,3^\circ$. Ihre Lösungen zeigen keine Multirotation. Die Harnstoffglucose reduziert als solche Fehlingsche Lösung nicht; kocht man sie jedoch mit alkalischer Kupferlösung einige Zeit, so erfolgt Spaltung und gleichzeitig Reduktion. Wegen Festlegung der Aldehydgruppe geht die Osazonbildung nur sehr langsam vor sich, nach Maßgabe der allmählich eintretenden Spaltung in Harnstoff und Traubenzucker. Durch Hefe wird die Ureidoglucose nicht angegriffen. In ähnlicher Weise wie die Eigenschaften des Traubenzuckers in der Ureidoglucose maskiert sind, ist auch das charakteristische Verhalten des Harnstoffes nicht vorhanden.

Die Tatsache, daß Carbamid und Traubenzucker unter relativ einfachen Bedingungen eine wohlcharakterisierte, feste Verbindung eingehen, die durch Kochen mit Säuren nur langsam wieder zerfällt, läßt es nicht unmöglich erscheinen, daß unter Umständen auch im tierischen Organismus eine Verbindung von Harnstoff und Glucose zustande kommt, da ja diese beiden Substanzen im Körper häufig zusammentreffen; es wäre mithin auch möglich, daß der Harn gelegentlich Ureidoglucose enthält. Es erscheint fernerhin denkbar, daß die Glucose in einem zuckerhaltigen Harn sich bei längerem Stehen desselben mit dem stets vorhandenen Harnstoffe verbindet und infolgedessen die Rechtsdrehung des Harns allmählich abnimmt.

Durch eine Reihe von Versuchen habe ich jedoch feststellen können, daß dies nicht der Fall ist. Ich habe sowohl Harne, denen ich Traubenzucker in verschiedener Konzentration zugesetzt hatte, als auch diabetische Harne von verschiedenem Zuckergehalt, und zwar einerseits solche, die von leichten Diabetikern stammten, andererseits auch stark aceton- und oxybuttersäurehaltige Harne mit und ohne Säurezusatz in Gegenwart von Chloroform im Brutschrank 24 bis 48 Stunden und selbst bis zu 8 Tagen stehen lassen, ohne jemals auch nur die geringste Abnahme der Rechtsdrehung konstatieren zu können.

Es erschien nun vor allem von Interesse, das Verhalten der Ureidoglucose im Tierkörper zu unter-

suchen. — Entweder könnte dieselbe glatt verbrannt werden oder zum Teil unverändert im Harn zur Ausscheidung gelangen. Die Verbrennung der Ureidoglucose könnte in der Weise erfolgen, daß sie in ihre Komponenten gespalten, und der abgespaltene Traubenzucker oxydiert wird. Es muß aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Ureidoglucose direkt zur Ureidoglucuronsäure oxydiert wird, deren Existenz von Neuberg[1]) festgestellt worden ist, und daß dann diese entweder zum Teil ausgeschieden wird oder der weiteren Zerstörung anheimfällt. Da die Ureidoglucuronsäure nach Neubergs Untersuchungen sehr unbeständig ist und sich schon spontan leicht zersetzt, so war es von vornherein sehr unwahrscheinlich, daß, falls der Abbau der Ureidoglucose über die Ureidoglucuronsäure erfolgt, die letztere in größerer Menge ausgeschieden werden, bzw. daß ihre Identifizierung im Harn einwandsfrei gelingen würde. Falls unveränderte Ureidoglucose ausgeschieden wurde, so konnte die Menge denselben aus der Linksdrehung des Harns, unter Zugrundelegung der spezifischen Drehung $[\alpha]_D = -23{,}3^\circ$, berechnet werden.

Ich habe für die in folgendem mitzuteilenden Versuche 200 g Ureidoglucose nach dem Verfahren von Schoorl dargestellt. Sämtliche Versuche wurden an Kaninchen ausgeführt, deren Nahrung aus 500 g Kohl pro Tag bestand. Der Harn wurde quantitativ gesammelt, wenn nötig, durch Auspressen aus der Blase entleert. Das Verhalten der Ureidoglucose bei der Passage durch den Tierkörper habe ich auf drei Wegen untersucht: bei Darreichung per os, bei subcutaner und intravenöser Verabfolgung.

A. Verhalten der Ureidoglucose bei Darreichung per os.

Versuch 1. Kaninchen von 2090 g erhält 10 g Ureidoglucose in 25 ccm Wasser mittels Schlundsonde per os. Der innerhalb der nächsten 24 Stunden entleerte Harn (250 ccm) ist optisch inaktiv und gärt nicht. Er reduziert Fehlingsche Lösung erst nach längerem Sieden. Nach vorherigem Kochen des Harns mit H_2SO_4 fällt die Reduktionsprobe sehr stark aus

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 97, 1905.

und verläuft in der für Glucose typischen Weise. Die Naphthoresorcinprobe auf Glucuronsäure ist negativ.

Das Verhalten des Harns gegen Fehlingsche Lösung berechtigt zu der Schlußfolgerung, daß geringe Mengen von Ureidoglucose in den Harn übergegangen sind, wenngleich derselbe keine Linksdrehung zeigte.

Versuch 2. Kaninchen von 2230 g erhält 10 g Ureidoglucose per os.

Harn (24 Stunden): 210 ccm.
Reaktion: alkalisch.
Reduktion: wie in Versuch 1.
Gärung: negativ.
Drehung: — 0,15 °/₀ (auf Glucose berechnet).
Naphthoresorcinprobe: stark positiv.

Das Verhalten des Harns gegen Fehlingsche Lösung sowie die Linksdrehung können sowohl durch Ureidoglucose als durch Ureidoglucuronsäure bedingt sein, zumal die stark positive Naphthoresorcinreaktion für die Anwesenheit von Glucuronsäure spricht. Daß das Kaninchen aber zweifellos Ureidoglucose ausgeschieden hat, wird durch die nach der Spaltung des Harns mit Säure auftretenden positive Gärungsprobe sicher erwiesen. 100 ccm Harn werden mit 10 ccm verdünnter H_2SO_4 1 Stunde lang im Wasserbade erhitzt und nach dem Erkalten mit Bariumcarbonat neutralisiert. Die abfiltrierte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade eingeengt und wieder auf genau 100 ccm aufgefüllt. Sie zeigt jetzt deutliche Gärung, dreht die Polarisationsebene 0,2 °/₀ nach rechts und reduziert sehr stark. Zwecks Nachweises der eventuell ausgeschiedenen Glucuronsäure werden 50 ccm dieser Lösung mit p-Bromphenylhydrazin behandelt; es gelang jedoch nicht, die Glucuronsäurebromphenylhydrazin-Verbindung zu isolieren.

Das Kaninchen hat somit ca. 0,7 g (aus der Linksdrehung des Harns berechnet) **Ureidoglucose ausgeschieden, und die positive Naphthoresorcinprobe spricht dafür, daß vielleicht auch Ureidoglucuronsäure in den Harn übergegangen ist.**

Versuch 3. Kaninchen von 2720 g erhält 15 g Ureidoglucose per os.

Der nach 24 Stunden entleerte Harn (130 ccm) reduziert in der für Ureidoglucose und Ureidoglucuronsäure typischen Weise, gärt nicht, gibt eine sehr deutliche Naphthoresorcinreaktion und dreht die Polarisationsebene 0,5 % nach links (auf Glucose berechnet). Nach der auf gleiche Art wie in Versuch 2 vorgenommene Spaltung mit H_2SO_4 reduziert der Harn erheblich stärker, zeigt eine Rechtsdrehung von 0,3 %, und die Gärungsprobe ist stark positiv.

Das Tier hat 1,1 g Ureidoglucose ausgeschieden, vielleicht auch geringe Mengen Ureidoglucuronsäure.

Die drei folgenden Versuche sind an Hungertieren angestellt.

Versuch 4. Kaninchen (2900 g) erhält am neunten Hungertage 10 g Ureidoglucose per os. Der innerhalb 24 Stunden entleerte Harn (60 ccm) dreht 0,3 % nach links und verhält sich hinsichtlich Reduktion und Gärung wie in den früheren Versuchen. Das Tier hat 0,4 g Ureidoglucose und, da die Naphthoresorcinreaktion positiv ist, vielleicht auch Ureidoglucuronsäure ausgeschieden.

Versuch 5. Kaninchen (3150 g) erhält am siebenten Hungertage per os 10 g Ureidoglucose. Der Harn (110 ccm) dreht 0,5 % nach links. Es sind 1,12 g Ureidoglucose ausgeschieden worden. Auch hier weist die positive Naphthoresoreinreaktion auf die mögliche Anwesenheit von Ureidoglucuronsäure hin.

Versuch 6. Kaninchen (2680 g) erhält am neunten Hungertage 10 g Ureidoglucose per os. Da der Harn (70 ccm) 1 % nach links dreht, so sind 2,2 g Ureidoglucose ausgeschieden worden. Die Naphthoresorcinprobe fällt negativ aus.

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß die Ureidoglucose bei Darreichung per os zu einem geringen Teil der Verbrennung entgeht, da bis zu 7 %, bei den Hungertieren sogar bis zu 22 %, unverändert im Harne zur Ausscheidung gelangen. Ob derjenige Anteil der Ureidoglucose, der im Körper zerstört wird, zunächst in Harnstoff und Traubenzucker gespalten oder aber zur Ureidoglucuronsäure oxydiert wird, konnte in exakter Weise nicht entschieden werden. Der in allen mit Ausnahme von zwei Versuchen positive Ausfall der Naphthoresorcinreaktion

macht es allerdings bis zu einem gewissen Grade[1]) wahrscheinlich, daß der Abbau der Ureidoglucose bei oraler Zufuhr über die Ureidoglucuronsäure erfolgt.

B. Verhalten der Ureidoglucose bei subcutaner und intravenöser Verabfolgung.

Versuch 7. Kaninchen von 2090 g erhält 10 g Ureidoglucose in 30 ccm Wasser unter die Haut gespritzt.

Harn (24 Stunden): 195 ccm.
Reaktion: alkalisch.
Reduktion: erfolgt erst nach längerem Kochen.
Drehung: — 1,3 °/₀ (auf Glucose berechnet).
Gärung: negativ.
Naphthoresorcinprobe: negativ.

100 ccm des Harns werden mit 100 ccm H_2SO_4 1 Stunde lang im Wasserbade erhitzt und nach dem Erkalten mit $BaCO_3$ neutralisiert. Der abfiltrierte und auf 100 ccm eingeengte Harn zeigt nun folgendes Verhalten:

Reduktion: sehr stark.
Drehung: + 1 °/₀.
Gärung: stark positiv.
Naphthoresorcinprobe: negativ.

50 ccm des nach der Säurebehandlung resultierenden Harns werden zur Darstellung des Osazons mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung behandelt. Das entstehende Osazon erweist sich durch den Schmelzpunkt von 204° und die N-Bestimmung (gef. 15,49 °/₀; ber. 15,64 °/₀) als Traubenzuckerosazon.

Das Tier hat 5,7 g Ureidoglucose, also 57 °/₀ der eingeführten Menge, ausgeschieden. Ureidoglucuronsäure ist nicht in den Harn übergegangen.

Versuch 8. Kaninchen (2720 g) erhält subcutan 5 g Ureidoglucose. Der innerhalb 24 Stunden entleerte Harn (200 ccm) dreht 0,4 °/₀ links und verhält sich hinsichtlich Reduktion und Gärung vor und nach der Spaltung mit Schwefelsäure wie in Versuch 7. Die Naphthoresorcinprobe ist negativ.

[1]) Vgl. die Erfahrungen von Neuberg und Mandel über die Naphthoresorcinreaktion, diese Zeitschr. 13, 148, 1908.

Das Tier hat 1,8 g, d. h. 36% der eingespritzten Ureidoglucose, aber keine Ureidoglucuronsäure ausgeschieden.

Versuch 9. Kaninchen (3120 g) erhält am achten Hungertage subcutan 9 g Ureidoglucose. Der Harn (100 ccm), der sich genau wie in den Versuchen 7 und 8 verhält und ebenfalls keine Naphthoresorcinprobe gibt, dreht 1,2% links.

Das Tier hat mithin 2,7 g Ureidoglucose (30%) ausgeschieden.

Versuch 10. Kaninchen (2230 g) erhält 1,5 g Ureidoglucose in die Ohrvene. Der Harn (190 ccm) zeigt die gleichen Eigenschaften wie bei den subcutanen Versuchen und gibt ebenfalls keine Naphthoresorcinreaktion. Da der Harn 0,2% links dreht, hat das Kaninchen 0,83 g, d. h. 55% Ureidoglucose ausgeschieden.

Versuch 11. Kaninchen (2720 g) erhält 4 g Ureidoglucose intravenös. Der Harn (140 ccm) verhält sich wie in den früheren Versuchen. Die Naphthoresorcinprobe ist auch hier negativ. Da der Harn 0,8% links dreht, hat das Tier 2,52 g, also 63% Ureidoglucose ausgeschieden.

Wenn ich das Ergebnis dieser Versuche zusammenfasse, so hat sich gezeigt, daß die Ureidoglucose bei oraler Zufuhr bis zu etwa 7% der Oxydation entgeht — bei hungernden Kaninchen ist auffallenderweise die Verwertung eine noch schlechtere —, und daß bei subcutaner Darreichung ca. 30 bis 60% und bei intravenöser Verabfolgung ca. 60% im Harne ausgeschieden werden.

Dieses Verhalten ist insofern recht bemerkenswert, als es zeigt, daß durch den einfachen Zusammentritt zweier im Organismus so verbreiteter Substanzen wie Harnstoff und Traubenzucker, deren biologischer Charakter gänzlich verändert wird, wie dies dadurch zum Ausdruck kommt, daß die Verbindung zu einem beträchtlichen Teil weder gespalten noch oxydativ abgebaut wird. Bei oraler Darreichung findet allerdings eine weitergehende Zerstörung der Ureidoglucose statt. Einmal muß man daran denken, daß durch bakterielle Prozesse im Magen-Darmkanal ein Teil der Ureidoglucose gespalten und eventuell gleich weiter verändert wird. Dann aber deutet auch die posi-

tive Naphthoresorcinreaktion, die im Gegensatz zu den subcutanen und intravenösen Versuchen bei Verabreichung per os sich fast stets einstellte, darauf hin, daß Ureidoglucuronsäure entstanden ist, wenn freilich auch der exakte Beweis hierfür nicht geliefert werden konnte.

Ich habe des weiteren untersucht, ob die Ureidoglucose der Glykogenbildung fähig ist. Dies war von vornherein sehr wahrscheinlich, da von Hungerkaninchen bei oraler Zufuhr ja immerhin mindestens 80% der Substanz im Organismus verwertet werden. In der Tat fand ich in zwei Versuchen, in denen zwei Kaninchen am neunten Hungertage 10 g Ureidoglucose per os erhielten, 0,4 und 0,75 g Glykogen in der Leber.

Digestionsversuche mit Leber.

Im Anschluß an die mitgeteilten Ergebnisse habe ich über Versuche zu berichten, durch die ich feststellen wollte, ob isolierte Organe, speziell die Leber, imstande sind, Traubenzucker aus der Ureidoglucose abzuspalten.

Diese Versuche ließen sich am einfachsten durch Digestion der Ureidoglucose mit Organbrei ausführen. Wenn die Leber bei diesem Prozesse Traubenzucker abspaltet, so müßte sich dies durch eine Zunahme des Glucosegehaltes des Leberbreies zu erkennen geben. Allerdings mußte man sich von vornherein sagen, daß ein positives Ergebnis nur bei groben Ausschlägen für eine Spaltung der Ureidoglukose sprechen würde. Denn da bei der Autolyse der Leber einerseits aus dem Glykogen Zucker entsteht, und ein Teil des gebildeten Zuckers durch Glykolyse wieder zerstört werden kann, und andererseits linksdrehende Eiweißabbauprodukte auftreten, so kann man a priori nicht wissen, ob nicht die Anwesenheit der Ureidoglucose den Ablauf dieser drei nebeneinander verlaufenden Prozesse irgendwie beeinflußt.

Versuch 1. Zwei normale Kaninchenlebern wurden unmittelbar nach dem Töten der Tiere zu einem Brei verrieben, und von dem gleichmäßig gemischten Leberbrei (160 g) werden zwei gleiche Portionen abgewogen. Portion I (60 g) wird mit 250 ccm Chloroformwasser und 3 g Ureidoglucose im Brutschranke 48 Stunden digeriert. Portion II (60 g) wird als Kontroll-

versuch ebenfalls mit 250 ccm Chloroformwasser ohne Zusatz von Ureidoglucose in der gleichen Weise behandellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden die Lösungen zum Sieden erhitzt, filtriert und bei schwach saurer Reaktion bis auf 50 ccm auf dem Wasserbade eingeengt. Der Zuckergehalt wird polarimetrisch und, nach Verdünnung der Lösungen auf das Vierfache, im Lohnsteinschen Gärungsapparat bestimmt.

Drehung	Zuckergehalt, aus der Drehung bestimmt	Zuckergehalt, durch Gärung bestimmt
I + 9 %	4,5 g	3,4 g
II + 7,8 %	3,9 „	3 „

Eine Lösung von 3 g Ureidoglucose in 250 ccm Chloroformwasser, die gleichzeitig 48 Stunden im Brutschrank belassen wurde, zeigte nach Einengung auf 50 ccm eine Linksdrehung von 2,7 % (auf Glucose berechnet); der Gehalt an Ureidoglucose hat sich also, wie sich unter Zugrundelegung der spezifischen Drehung der Ureidoglukose ($[\alpha]_D = -23{,}3$) leicht berechnen läßt, nicht verändert. Wenn auch in Portion I etwas mehr Zucker als in Portion II gefunden wurde, so wird man unter Berücksichtigung der besprochenen Einwände doch höchstens die Möglichkeit zugeben dürfen, daß eine geringe Spaltung der Ureidoglucose durch Leberbrei stattgefunden hat.

Versuch 2. In einem zweiten Versuch, der in der gleichen Weise ausgeführt wurde, habe ich die Digestion 76 Stunden andauern lassen. Das Resultat ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

		Drehung, auf Glucose berechnet	Zuckergehalt, durch Drehung bestimmt	Zuckergehalt, durch Gärung bestimmt
I. 50 g Leberbrei + 3 g Ureidoglucose	in 250 ccm Chloroformwasser	+ 7,2 %	3,6 g	2,8 g
II. 50 g Leberbrei	in 250 ccm Chloroformwasser	+ 6,5 „	3,25 „	2,8 „

Da dieses Ergebnis überhaupt keine Schlußfolgerung zuläßt, habe ich noch zwei Versuche mit Leberpulver vorgenommen, das nach den Angaben von Arnheim und Rosenbaum[1]) dargestellt war.

Die folgende Zusammenstellung veranschaulicht das Resultat dieser Versuche.

		Drehung der auf 50 ccm eingeengten Lösung, auf Glucose berechnet	Zuckergehalt, aus der Gärung bebestimmt
I. 3 g Ureidoglucose + 1 g Leberpulver	in 100 ccm Chloroformwasser. 48 St. im Brutschrank	— 1 %	0,3 %
II. 3 g Ureidoglucose		— 1,4 %	0
III. 1 g Leberpulver		inaktiv	0,25 %
I. 3 g Ureidoglucose + 2 g Leberpulver	in 100 ccm Chloroformwasser 48 St. im Brutschrank	— 0,9 %	0,52 %
II. 3 g Ureidoglucose		— 1,4 „	0
III. 2 g Leberpulver		Spur Linksdrehung	0,45 %

Wenn ich auch diese Versuche zur Entscheidung der aufgerollten Frage nicht für absolut beweisend und einwandfrei halte, so sprechen sie doch wohl dafür, daß die Leber wenigstens in geringem Grade die Fähigkeit hat, die Ureidoglucose zu spalten.

Ob der Ureidoglucose eine physiologische Bedeutung zukommt, ob sie unter normalen oder pathologischen Verhältnissen im Tierkörper entstehen kann, dürfte zurzeit schwer festzustellen sein.

Wenn dies unter irgendwelchen Umständen der Fall wäre, so müßte noch am ehesten bei sehr reichlicher Anwesenheit von Harnstoff und Traubenzucker hierzu Gelegenheit gegeben sein.

Ich habe eine Reihe diesbezüglicher Versuche angestellt, die ich im einzelnen nicht wiedergebe, da es mir selbst bei Zufuhr enormer Mengen von Harnstoff und Traubenzucker (bis zu 30 g Harnstoff und 50 g Glucose) niemals gelang, Ureidoglucose im Urin nachzuweisen.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 220. 1903.

Da nach Schoorls Untersuchungen nicht nur der Traubenzucker, sondern auch andere Hexosen, wie die Galaktose und die Mannose, ferner Pentosen und einige reduzierende Disaccharide, der Milchzucker und die Maltose, mit dem Harnstoff Verbindungen eingehen, so wäre es von Interesse, auch das Verhalten dieser Ureide im Tierkörper zu studieren, da es immerhin möglich ist, daß diesen anderen Harnstoffzuckern eine biologische Bedeutung zukommt.

Über die Sublimathemmung und die Reaktivierung der Fermentwirkungen.

Von

S. Hata, Tokio.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 10. März 1909.)

M. Jacoby[1]) hat vor längerer Zeit festgestellt, daß die Autolyse bei der Phosphorvergiftung gesteigert ist. An diese Beobachtung knüpfen zahlreiche Untersuchungen über den Einfluß von Giften auf die Organfermente und insbesondere über den verschiedenen Einfluß von Giften auf Organ- und Sekretfermente an. Man hat Fermenthemmungen und Steigerungen der Wirkungen gefunden.

Im Wintersemester 1902/03 hat Herr Dr. Rockenbach auf Veranlassung von Herrn Professor Jacoby im Heidelberger pharmakologischen Institut sich mit Untersuchungen über die Einwirkung des Sublimats auf die Leberfermente beschäftigt. Die Versuche schienen dafür zu sprechen, daß die einzelnen Fermentgruppen verschieden durch Sublimat geschädigt werden. Inzwischen sind zahlreiche Angaben veröffentlicht worden, welche über den Einfluß des Sublimats auf Fermente berichten. Im allgemeinen wurde natürlich Schädigung der Fermente durch das Gift beobachtet, vereinzelt aber auch Steigerung der Fermentwirkung beschrieben.

Das Sublimat bietet wegen seiner stark desinfizierenden Wirkung bei Fermentstudien besonderes Interesse. Es könnte möglich sein, daß die Desinfektionswirkung zum Teil auf einer Änderung der Fermenttätigkeit beruht.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 174, 1900.

Es sei gleich von vornherein betont, daß es nicht gelang, Steigerung der Fermentwirkung durch Sublimat ausfindig zu machen.

Im Verlaufe der Arbeit ergab sich die neue Fragestellung, ob die Fermentschädigung durch Sublimat auf einer sofortigen Fermentzerstörung beruht oder ob es nicht vielleicht möglich ist, die Wirkung des Sublimats mit einer geeigneten Methode rückgängig zu machen. Das konnte in der Tat nachgewiesen werden.

I. Einfluß des Sublimats auf verschiedene Fermentwirkungen.

Um den Einfluß eines Mittels auf die Fermente zu studieren, muß man natürlich eine zuverlässige Methode für die quantitative Messung der Fermentwirkungen in der Hand haben. So war es unsere erste Aufgabe, die modernen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Fermenten auf ihre Empfindlichkeit und Genauigkeit vergleichend zu prüfen. Mit der dann ausgewählten Methode wurde zunächst die Wirksamkeit des zu untersuchenden Ferments bestimmt. Eine gewisse Menge eines Ferments, dessen Kraft schon bestimmt war, wurde dann dem Einfluß des Sublimats unterworfen. Mit anderen Worten: zu verschiedenen Vielfachen und Bruchteilen von der bestimmten Dose jedes Ferments, welche die fermentative Reaktion in einem bestimmten Zeitraum bei bestimmter Temperatur eben komplett zu bewerkstelligen genügt, wurde wieder eine verschiedene Menge von Sublimat zugesetzt. Nachdem das Sublimat eine Stunde lang bei Zimmertemperatur auf das Ferment eingewirkt hatte, wurde jedes Sublimatfermentgemisch auf seine fermentative Wirksamkeit untersucht. Nach diesem Arbeitsplan wurde das Pepsin, das Trypsin, das Lab, der Speichel, das proteolytische Ferment der Leber und die Katalase auf ihr Verhalten gegen den Einfluß des Sublimats untersucht.

a) Pepsin.

Als Ferment stand mir Grüblers Pepsin puriss. zur Verfügung. Zur quantitativen Bestimmung brauchte ich die Jacobysche[1]) Ricinmethode, weil sie sich mir bei den Vorversuchen am besten bewährt hatte.

[1]) Diese Zeitschr. 1, 59, 1906. Vgl. auch Solms, Zeitschr. f. klin. Med. 64, 1907.

Das Ricinpräparat von den vereinigten chem. Werken zu Charlottenburg wird in einer Reibschale zerrieben, mit 5 %iger Kochsalzlösung zu einer 1 ‰igen Lösung verarbeitet. In eine Reihe von Reagensgläsern werden absteigende Mengen des Pepsins eingefüllt, mit Wasser auf gleiches Volumen aufgefüllt, dann kommt dazu je 0,5 ccm von $^{n}/_{10}$-Salzsäurelösung und 2 ccm von der genannten Ricinlösung. Dabei tritt eine deutliche Trübung der Lösung ein. Die Gläser werden nun in einen Brutschrank von 38° hineingestellt. Nach 3 Stunden beobachtet, bleibt ein Teil der Röhrchen noch trüb, während der andere, wo genügendes Enzym sich vorfindet, schon ganz klar geworden ist.

Nach dieser Methode zeigte das Pepsinpräparat solch eine Wirksamkeit, daß es in einer Menge von 0,000 001 g eben imstande war, 2 ccm der 1 ‰igen Ricinlösung mit dem genannten Salzsäuregehalt binnen 3 Stunden bei 38° aufzuklären, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle I.

Pepsinmenge (Lösung 1 : 100,000) in ccm	Wasser	$^{n}/_{10}$-HCl	Ricinlösung 1:1000	Nach 3 Stunden bei 38°
0	2,0	0,5	2,0	trüb
0,05	1,95	0,5	2,0	schwach trüb
0,1	1,9	0,5	2,0	fast ganz klar
0,2	1,8	0,5	2,0	ganz klar
0,5	1,5	0,5	2,0	"
1,0	1,0	0,5	2,0	"

Tabelle II.

Pepsinlösung (1 : 1 000 000) in ccm	Wasser	$^{n}/_{10}$-HCl	Ricinlösung	Nach 3 Stunden bei 38°
0	2,0	0,5	2,0	trüb
0,5	1,5	0,5	2,0	schwach trüb
0,7	1,3	0,5	2,0	ganz schwach trüb
1,0	1,0	0,5	2,0	fast g. klar (Spürch. trüb.)
1,5	0,5	0,5	2,0	ganz klar

Nachdem diese Wirksamkeit des Pepsins wiederholt konstant gefunden war, wurde zu einem gewissen Multiplum der eben lösenden Dose eine Reihe von steigenden Mengen einer Sublimatlösung gesetzt. Nach einer Stunde langem Stehen bei Zimmertemperatur wurden je 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl und 2 ccm Ricinlösung hinzugefügt und weiter beobachtet, wie die folgende Tabelle zeigt.

Tabelle III.

Sublimatversuch mit 10fach lösender Dose von Pepsin.

Sublimatlösung (1:100)	H_2O	Pepsinlösung (1:100 000)		$^{n}/_{10}$-HCl	Ricinlösung (1:1000)	Nach 3 Stunden bei 38°
0	2,0	0	nach 1 Stunde	0,5	2,0	trüb
0	1,0	1,0		0,5	2,0	ganz klar
0,05	0,95	1,0		0,5	2,0	"
0,1	0,9	1,0		0,5	2,0	"
0,2	0,8	1,0		0,5	2,0	"
0,5	0,5	1,0		0,5	2,0	Spur Trübung
1,0	0	1,0		0,5	2,0	schwache Trübung

In dieser Weise werden die Versuche mit verschiedenen Mengen Pepsin angestellt. Die gesamten Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle IV.

Pepsinmenge		Sublimatmenge in g berechnet								
in g	in lösend. Dose	0	0,00005	0,0001	0,0002	0,0005	0,001	0,002	0,005	0,01
0,00001	10 ×	klar				klar	klar	klar	sp. trüb	schw. trü
0,000005	5 ×	"				"	"	sp. trüb	schw. trüb	ganz trüb
0,000002	2 ×	"			klar	"	schw. trüb	schw. trüb	deutl. trüb	ganz trüb
0,000001	$^{1}/_{1}$	Spürch. trüb	Spürch.	Spürch.	Spürch.	sp. trüb	schw. trüb	schw. trüb		
0,0000005	$^{1}/_{2}$	schwach trüb	schwach trüb	schwach trüb	schwach trüb	deutl. trüb	ganz trüb			
0,0000002	$^{1}/_{5}$	schwach trüb	schwach trüb	schwach trüb	schwach trüb	deutl. trüb				
0,0000001	$^{1}/_{10}$	stark trüb	stark trüb	stark trüb	ganz trüb					
0	0	ganz trüb								

Wie man aus diesen Resultaten ersieht, zeigt das Sublimat überall eine Schädigung, aber in keinem Fall eine Andeutung von Steigerung der Fermenttätigkeit. Es bleibt aber wohl noch eine Möglichkeit, daß, wenn das Sublimat zunächst auf das Ricin und erst dann auf das Ferment einwirkt, die Verdauung verstärkt wird. Um diese Vermutung zu prüfen, veränderte ich die Versuchsanordnung folgendermaßen: Zu 2 ccm Ricin wurde eine Reihe von steigenden Mengen des Sublimats zugesetzt, und mit Wasser auf gleiches Volumen aufgefüllt. Nach einer Stunde kamen dazu eine gewisse Menge Pepsins und Salzsäure. Bei dieser Versuchsanordnuug bleiben aber die Resultate ganz die gleichen wie bei der vorigen, so daß es überflüssig ist, die einzelnen Resultate hier wiederzugeben.

b) Trypsin.

Grüblers Trypsin sicc. wurde zu den Versuchen gebraucht. Als Methode benutzte ich die Caseinmethode, und zwar nach den Fuldschen Vorschriften in der Art, wie sie von v. Bergmann und Meyer[1]) beschrieben worden ist.

Ein Gramm Casein wird unter leichter Erwärmung in 100 ccm $^{n}/_{10}$-NaOH gelöst, die Lösung mit $^{n}/_{10}$-HCl (etwa 80 ccm) gegen Lackmus neutralisiert und mit 0,85 % NaCl auf 1000 ccm gebracht. Trypsin wird mit einer physiologischen Kochsalzlösung, von der 100 ccm 1 ccm von normaler Sodalösung enthalten, auf 1 % gelöst, und vor Gebrauch weiter mit physiologischer Lösung verdünnt. In eine Reihe von Reagensgläsern werden absteigende Mengen Trypsins eingefüllt, mit physiologischer Kochsalzlösung auf gleiches Volumen aufgefüllt. Dazu setzt man je 2 ccm von der Caseinlösung. Nach dreistündiger Verdauung im Brutschrank werden in die Röhrchen einige Tropfen 5 %iger Essigsäure (Essigsäure 5 ccm, Alkohol 45 ccm, Wasser 50 ccm) getropft. In denjenigen Röhrchen, in denen das Casein bereits verdaut ist, tritt keine Trübung ein, während in den anderen, wo noch unverdautes Casein sich vorfindet, mehr oder minder deutliche Trübung zu erkennen ist.

Unser Präparat hatte eine solche Wirksamkeit, daß es in einer Dose von 0,0001 g die vollständige Verdauung von 2 ccm Caseinlösung binnen 3 Stunden vollendet.

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1908, 1673.

Tabelle V.

Trypsinmenge Lösung 1:1000	0,85 % NaCl	Casein 1:1000	Nach 3 Stunden bei 38°
0	2,0	2,0	trüb
0,05	1,95	2,0	schwach trüb
0,1	1,9	2,0	ganz klar
0,2	1,8	2,0	"
0,5	1,5	2,0	"
1,0	1,0	2,0	"
Lösung 1:10 000			
0,5	1,5	2,0	schwach trüb
0,7	1,3	2,0	Spur trüb
1,0	1,0	2,0	klar
1,5	0,5	2,0	"

Mit denselben zweierlei Versuchsanordnungen, wie sie bei Pepsinversuchen angewandt waren, wurde der Einfluß des Sublimats auf die Trypsinwirkung untersucht, die Resultate fielen ganz gleichsinnig aus, wie aus folgender Generaltabelle ersichtlich ist.

Tabelle VI.

Trypsinmenge		Sublimatmenge in g								
in g	in lösend. Dosen	0	0,00005	0,0001	0,0002	0,0005	0,001	0,002	0,005	0,01
0,001	10 ×	klar				klar	klar	sp. trüb	sp. trüb	schw. trüb
0,0005	5 ×	"				"	"	"	schw. trüb	deutl. trüb
0,0002	2 ×	"			klar	"	sp. trüb	schwach trüb	deutl. trüb	ganz trüb
0,0001	1/1	"	klar	klar	sp. trüb	sp. trüb	sp. trüb			
0,00005	1/2	schwach trüb	schwach trüb	schwach trüb	deutlich trüb	deutlich trüb	deutlich trüb			
0,00002	1/5	schwach trüb	schwach trüb	schwach trüb	deutlich trüb	ganz trüb				
0,00001	1/10	stark trüb	stark trüb	ganz trüb	ganz trüb					
0	0	ganz trüb								

c) Lab.

Nach der Morgenrothschen Methode[1]) wurde das Labpulver puriss. solub. von Fr. Witte, Rostock, auf seine Wirksamkeit geprüft.

[1]) Centralbl. f. Bakt. 26, 1899.

Zu einer Reihe von Reagensgläsern, welche steigende Mengen von Labferment enthalten und mit physiologischer Kochsalzlösung auf gleiches Volumen aufgefüllt und einige Stunden lang im Eisschrank abgekühlt sind, wird je 5 ccm von frischer mit Chloroform versetzter und ebenfalls vorher abgekühlter Kuhmilch zugesetzt. Die Röhrchen bleiben über Nacht im Eisschrank. Morgens werden sie in den Brutofen gestellt. Nach 2 Stunden betrachtet, ist die Milch in einem Teile der Röhrchen noch flüssig, während sie bei den anderen, wo eine genügende Menge von Lab vorhanden ist, schon geronnen ist.

Das Labpräparat, welches zu meinem Versuche angewandt war, zeigte folgende Kraft.

Tabelle VII.

Labmenge Lösung 1:100000	0,85 °/₀ NaCl	Resultate nach 20 Std. im Eisschrank und 2 Std. bei 38°	
		Versuch I Milch 5 ccm	Versuch II eine andere Milch 5 ccm
0	2,0	flüssig	flüssig
0,3	1,7	"	"
0,4	1,6	"	"
0,5	1,5	weich geronnen	"
0,6	1,4	fest geronnen	weich geronnen
0,7	1,3	"	fest geronnen
0,8	1,2	"	"
1,0	1,0	"	"

Bevor ich die Resultate der Versuche, welche den Einfluß des Sublimats auf das Labferment zu ermitteln versuchen, erörtere, sind noch einige Vorbemerkungen zu machen. Erstens hat die einzelne Milch ihre eigene Empfindlichkeit. Wenn auch der Unterschied zwischen den einzelnen nicht sehr beträchtlich ist, muß dies jedoch bei genauen vergleichenden Untersuchungen immer berücksichtigt werden. Zweitens spielt bei der Labung der Milch, wie schon lange bekannt ist, die Salzkonzentration des Mediums, besonders die des Calciums und Natriums eine große Rolle. Wenn man zu einer bestimmten Menge der Milch steigende Mengen von destilliertem Wasser setzt, so ruft die durch Wasserzusatz bedingte Verminderung an Salzkonzentration eine bedeutende und mit der Wassermenge immer zunehmende Erniedrigung der Empfindlichkeit der Milch gegen die Labung hervor. Kommt statt Wasser die physiologische Kochsalzlösung zur Anwendung, so tritt die

Erniedrigung der Empfindlichkeit in etwas geringerem Maße ein. Wenn aber die Menge der Kochsalzlösung groß ist, so ist es nicht zu vermeiden, daß man eine bedeutende der Verminderung der Calciumkonzentration entsprechende Unempfindlichkeit der Milch erhält. In diesem Fall ist ein Zusatz von einer ganz kleinen Menge eines Calciumsalzes allein imstande, die verminderte Empfindlichkeit wieder auf den urspünglichen Grad zurückzubringen.

Tabelle VIII.

Labmenge 0,1 ccm von folgenden Verdünnungen	Milch 5 ccm ohne Zusatz	Milch 5 ccm Wasser 3 ccm	Milch 5 ccm 0,85 % NaCl 3 ccm	Milch 5 ccm H_2O 5 ccm	Milch 5 ccm 0,85 % NaCl 5 ccm	Milch 5 ccm 0,85 % NaCl, 0,1 % $CaCl_2$ } 5 ccm
1 : 500	+	+	+	+	+	+
1 : 1000	+	+	+	—	+	+
1 : 2000	+	+	+	—	+	+
1 : 5000	+	+	+	—	+	+
1 : 10000	+	—	+	—	—	+
1 : 20000	+	—	—	—	—	+
1 : 50000	—	—	—	—	—	—

Bei unseren Sublimatversuchen brauchen wir aber 5 ccm Milch nur um 2 ccm zu verdünnen. 2 ccm von physiologischer Kochsalzlösung rufen aber noch keine bedeutende Herabsetzung der Reaktionsfähigkeit von 5 ccm Milch hervor, während destilliertes Wasser in derselben Menge es schon tut.

Tabelle IX.

Lab 0,1 ccm von folgenden Verdünnungen	Milch 5,0 ccm Ohne Zusatz	Milch 5 ccm H_2O 2 ccm	Milch 5 ccm 0,85 % NaCl 2 ccm
1 : 5000	+	+	+
1 : 7000	+	+	+
1 : 10000	+	±	+
1 : 15000	+	—	+
1 : 20000	±	—	—
1 : 30000	—	—	—

Für unseren Zweck genügt es also, daß wir das für Lab und Sublimat erforderliche Volumen von 2 ccm in einer Salzkonzentration von nicht weniger als 0,85 %ige NaCl halten. Daher wurde zur Herstellung der Lab- und Sublimatlösung und zur Auffüllung derselben nur physiologische Kochsalzlösung an-

gewandt. Die weitere Versuchsanordnung braucht keine besondere Erklärung und ist aus dem folgenden Beispiele leicht ersichtlich.

Tabelle X.

Sublimatlösung 1 : 100	0,85 % NaCl	Lablösung 1 : 10000		Milch	Nach 20 Stunden im Eisschrank und 2 Stunden bei 38°
0	2,0	0	Nach 1 Stunde	5,0	flüssig
0	1,0	1,0		5,0	fest geronnen
0,05	0,95	1,0		5,0	"
0,1	0,9	1,0		5,0	"
0,2	0,8	1,0		5,0	"
0,3	0,7	1,0		5,0	weich geronnen
0,5	0,5	1,0		5,0	flüssig

Solche Versuche wurden mit verschiedenen Dosen von Ferment angestellt, und zwar aus dem oben erwähnten Grunde am selben Tage mit derselben Milch. Sie zeigten die folgenden Resultate.

Tabelle XI.

Labmenge		Sublimatmenge in Gramm						
in Gramm	in Dose	0	0,00003	0,00005	0,001	0,002	0,003	0,005
0,00001	10 ×	+		+	+	+	±	—
0,00005	5 ×	+		+	+	±	—	—
0,00001	1/1	±	±	—	—	—	—	—
0,000005	1/2	—	—	—	—	—	—	—
0,000002	1/5	—	—	—	—	—	—	—
0	0	—						

+: fest ±: weich geronnen —: flüssig.

Bei der anderen Versuchsanordnung, wo das Sublimat erst der Milch zugesetzt war, waren die Resultate ganz gleich wie oben.

d) Speicheldiastase.

Eigener Vormittagsspeichel wurde als Versuchsobjekt gebraucht. Zur quantitativen Bestimmung seiner diastatischen Wirkung wurde das Wohlgemuthsche Verfahren[1]) angewandt.

[1]) Diese Zeitschr. 9, 1, 1908.

Zu einer Reihe von steigenden Mengen Speichels, welcher mit Wasser auf 2 ccm aufgefüllt ist, werden je 5 ccm von 1%igem Stärkekleister aus Kahlbaumscher löslicher Stärke zugesetzt. Nach 1stündiger Digestion im Brutofen werden die Röhrchen im Eisschrank abgekühlt, mit ca. 5 ccm Wasser verdünnt, und mit einem Tropfen Lugolscher Lösung versetzt. In denjenigen Röhrchen, in denen die Stärke sich schon in Achrodextrin oder weiter in Zucker verwandelt hat, färbt sich die Flüssigkeit gar nicht oder nur wenig bräunlich, während bei denjenigen, die noch Erythrodextrin enthalten, violette, und in den anderen, Amydextrin oder noch unverändertes Amylum enthaltenden Röhrchen eine blaue Färbung erscheint. Zwischen diesen kommt noch manchmal ein solches Röhrchen vor, bei welchem es bläulich-violett reagiert. In diesem Fall hat der Autor noch einen Tropfen Jodlösung zugetan, um dadurch das Resultat endgültig zu entscheiden. Zu demselben Zweck brauche ich Chloroform. Schüttelt man mit etwa 5 ccm Chloroform die bläulich-violette Lösung, so scheidet sich beim Stehen das Chloroform von der Lösung ab, welches das freie Jod in sich aufnimmt und sich rötlich färbt, während es denjenigen Teil des Jods, welcher mit Amylum sich verbunden hat, in dem obenstehenden Wasser zurückläßt, wodurch das Wasser noch etwas blau bleibt. Wenn also das Wasser ganz farblos wird, ist es ein Zeichen der vollständigen Verdauung der Stärke, solche Röhrchen bezeichne ich mit +. Falls dagegen das Wasser noch ein bißchen blau bleibt, dann zeigt es das Vorhandensein von noch unverdauter Stärke und wird mit $\underline{+}$ bezeichnet.

Obwohl die Kraft des Speichels ziemlich konstant war, zeigte sie doch jeden Tag kleine Schwankungen. Einige Beispiele werden in der Tabelle XII gezeigt.

Der Einfluß des Sublimates auf verschiedene Mengen des Speichels muß also mit demselben Speichel untersucht werden. Die Versuchsanordnung war aber ganz einfach. Nachdem nämlich der Speichel und das Sublimat in verschiedenem Verhältnisse gemischt und 1 Stunde lang bei Zimmertemperatur geblieben war, wurden die Gemische mit 5 ccm Stärkekleister versetzt, und die Prüfungen weiter in der oben beschriebenen Weise ausgeführt. Die Tabelle XIII zeigt ein Beispiel einer derartigen Untersuchungsreihe mit ihren Resultaten.

Tabelle XII.

Speichelmenge in ccm		Stärkelösung 1%	Resultate nach 1 stündiger Verdauung bei 38°		
			Versuch I	Versuch II	Versuch III
0,016	Mit Wasser verdünnt und auf 2 ccm aufgefüllt	5,0	+	+	+
0,01		5,0	+	+	+
0,0064		5,0	+	+	+
0,004		5,0	+	±	+
0,0025		5,0	±	—	—
0,0016		5,0	—	—	—
0,001		5,0	—	—	—
0		5,0	—	—	—

Tabelle XIII.

Sublimatlösung (1 : 100) in ccm	Speichelmenge in ccm						
	0,016	0,01	0,0064	0,004	0,0025	0,0016	0
0,003	—	—					—
0,001	—	—	—				—
0,0003	+	+	—	—			—
0,0001	+	+	+	—	—		—
0,00003	+	+	+	+	—	—	—
0,00001	+	+	+	+	+	—	—
0,000003	+	+	+	+	+	—	—
0,000001	+	+	+	+	+	—	—
0	+	+	+	+	+	—	—

e) Gelatinolytisches Ferment der Pferdeleber.

Dieses Ferment[1]) wurde aus einer Pferdeleber mit verdünnter Salzsäure extrahiert, mit Sodalösung neutralisiert und filtriert.

Zu einer Reihe von steigenden Mengen des Filtrates, welche alle mit Wasser auf 2 ccm aufgefüllt sind, werden je 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl und 2 ccm 5%iger Gelatinelösung zugesetzt. Nach 6stündiger Digestion im Brutschrank werden die Röhrchen in einen Eisschrank gestellt. Am nächsten Morgen ist die Gelatinelösung noch flüssig oder wieder geronnen, je nach der zugesetzten Fermentmenge.

---

[1]) Diese Zeitschr. 16, 383, 1909.

Das Leberextrakt, welches zu vorliegenden Versuchen gebraucht wurde, hatte die folgende Wirkung:

Tabelle XIV.

Filtratmenge in ccm		n/10 ClH	Gelatine 5%	Resultate nach 6 Stunden bei 38°	Resultate nach 12 Stunden bei 38°
1,0	Mit Wasser auf 2 ccm aufgefüllt	0,5	2,0	flüssig +	
0,7		0,5	2,0	„ +	
0,5		0,5	2,0	„ +	+
0,4		0,5	2,0	weich ±	+
0,3		0,5	2,0	fest —	—
0,2		0,5	2,0	„ —	—
0,1		0,5	2,0	„ —	—
0		0,5	2,0	„ —	—

Mit diesem Extrakt wurde der Einfluß des Sublimats untersucht. Die Versuchsanordnung war ganz die gleiche wie beim Speichel und bedarf keiner Erklärung.

Tabelle XV.

Sublimatlösung (1:100) in ccm	Filtratmenge in ccm										
	1,0		0,5		0,4		0,3		0,2		0
	6 St.	12 St.	6 St.	12 St.	6 St.	12 St.	6 St.	12 St.	6 St.	12 St.	12St.
0,1	—	—	—	—	—	—					—
0,03	—	—	—	—	—	—					—
0,01	+	+	—	—	—	—					—
0,003	+	+	±	+	—	—	—	—	—	—	—
0,001	+	+	±	+	—	±	—	—	—	—	—
0,0003			+	+	±	±	—	—	—	—	—
0,0001			+	+	±	+	—	—	—	—	—
0,00003			+	+	±	+	—	—	—	—	—
0	+	+	+	+	±	+	—	—	—	—	—

f) H_2O_2 zersetzendes Ferment.

Aus Kaninchenblutkörperchen habe ich nach Senter[1]) eine wirksame Fermentlösung gewonnen. Ferner bekam ich aus dem oben beschriebenen Leberextraxt eine Katalaselösung, und zwar in einer durch fraktionierte Fällung etwas gereinigten Form.

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 44, 1903.

Diese Fraktionierung führte ich auch nach der Senterschen Vorschrift mit Alkohol aus. Die Resultate der Sublimatversuche mit beiden Fermentlösungen fielen im ganz übereinstimmenden Sinne aus, so daß es überflüssig ist, alle Versuche hier wiederzugeben. Zur quantitativen Bestimmung der katalytischen Wirkung brauchte ich auch die von Senter beschriebene Titrierungsmethode.

Zu meinen Untersuchungen benutzte ich $^n/_{100}$-Lösung sowohl des Kaliumpermanganates als auch des Wasserstoffperoxyds. In eine Reihe von gleichgroßen und gleichförmigen mit Glasstöpseln versehenen Flaschen, welche chemisch ganz gereinigt waren, wurden steigende Mengen von Fermentlösung eingefüllt und mit destilliertem Wasser auf 3 ccm aufgefüllt. Die Flaschen wurden nun im Eiswasser auf 0° abgekühlt. Dazu wurden je 10 ccm von ebenfalls vorher abgekühlter $^n/_{100}$-H_2O_2-Lösung zugesetzt. Nach Verlauf von einem Zeitraum von 60 Minuten bei 0° wurden je 10 ccm von 10%iger Schwefelsäure zugesetzt und dann mit $^n/_{100}$-Permanganatlösung titriert.

Folgende Tabelle zeigt die Versuchsmethode und die Kraft der Kaninchenblutkatalase.

Tabelle XVI.

Ferment-lösung in ccm		Abgekühlte $^n/_{100}$-H_2O_2-Lösung in ccm		Zur Titrierung gebrauchte $^n/_{100}$-KMO_4-Lsg. in ccm	Zersetztes H_2O_2 in ccm	Zersetztes H_2O_2 in %
0,2	Alle mit Wasser auf 3 ccm aufgefüllt und im Eiswasser abgekühlt	10	Nach 1 Stunde bei 0° angesäuert	1,3	8,7	87
0,1		10		1,1	8,9	89
0,05		10		0,8	9,2	92
0,02		10		1,0	9,0	90
0,01		10		3,2	6,8	68
0,005		10		6,25	3,75	37,5
0,002		10		8,0	2,0	20
0,001		10		9,2	1,8	18
0,0005		10		9,6	1,4	14
0,0002		10		9,65	1,35	13,5
0		10		10,0	0	0
0		10		9,95	0	0
Kontrolle ohne H_2O_2						
0,2	Wasser 12,8			1,2		

Diejenige Menge des Ferments, welche 90%ige Zersetzung des H_2O_2 hervorzurufen eben imstande war, habe ich als höchste Versuchsdose bestimmt, weil über diese Dose hinaus wieder eine scheinbar schwächere Fermentkraft bemerkbar war, welche durch die permanganatreduzierende Kraft der noch in der Fermentlösung etwas vorhandenen organischen Substanzen vorgetäuscht wird, wie der Kontrollversuch ohne H_2O_2-Zusatz zeigt.

Zu den Sublimatversuchen nahm ich also diejenigen zwei Dosen der Fermentlösung, welche 90%, resp. 30% des H_2O_2 zersetzen. Den Flaschen, welche steigende Mengen von Sublimatlösung, auf 2 ccm aufgefüllt, enthalten und in Eiswasser abgekühlt sind, wird eine bestimmte Dose des Ferments, welche in 1 ccm Volumen sich befindet und auch vorher abgekühlt ist, zugesetzt. Nach 1 Stunde werden dazu je 10 ccm von ebenfalls abgekühlter $^n/_{100}$-Lösung zugesetzt. Nach wiederum 60 Minuten wird das Gemisch mit Schwefelsäure angesäuert und mit Permanganatlösung titriert. Die Gesamtergebnisse mit verschiedenen Dosen des Ferments lassen sich wie folgt zusammenstellen.

Tabelle XVII.

Sublimatmenge 1:100	Fermentmenge					
	0,02 (90% zersetzende Dose)			0,004 (30% zersetzende Dose)		
	Versuch I %	II %	III %	Versuch I %	II %	III %
0,1	1,5	1,5				
0,03	5	6			1	
0,01	15	18		4	3,5	
0,003	52	54		11	12	
0,001	74	76	74	23,5	22	21
0,0003	78	80	78,5	28,5	28,5	27
0,0001	83	84	84	29	29	29
0,00005	—	—	86	—	—	29,5
0,00003	86	86,5	86,5	29	30	29,5
0,00002	—	—	87	—	—	30
0,00001	85	84	89	29	30,5	29,5
0,000003	88	89	—	29	30,5	—
0	89	90	90	29,5	30,5	30,5

In der Tabelle bemerkt man, daß bei der Sublimatmenge von 0,00003 in den Versuchen I und II ein etwas umgekehrtes

Verhältnis der Resultate hervortrat. Solches Verhältnis habe ich auch bei den Versuchen mit Leberkatalase einige Male bemerkt und zwar bei eben derselben Sublimatmenge. Die Zersetzung des H_2O_2 bei dieser Sublimatmenge war zwar ein wenig größer als bei naheliegenden Mengen, aber immerhin kleiner als bei der Kontrolle ohne Sublimat. Ob dieses Paradox eine etwaige Stimulation der Fermentwirkung anzeigt oder vielmehr nur ein zufälliges Ereignis ist, will ich vorläufig dahingestellt bleiben lassen.

Alle bisherigen Versuche zeigen also nur schädigende Wirkungen des Sublimats auf die Fermenttätigkeiten. Dabei ist besonders zu bemerken, daß das Sublimat erst bei großen Mengen imstande ist, dem Pepsin, Trypsin und Lab ihre Wirksamkeit zu rauben, während es die Wirkung der Diastase, des gelatinolytischen Leberfermentes und der Katalase schon in sehr kleinen Dosen aufhebt. Niemals gelang es mir, eine sichere Beförderung der Fermentwirkung durch Sublimat zu beobachten.

II. Wiederherstellung der durch Sublimat gehemmten Fermentwirkung.

Um die Frage zu beantworten, ob das Sublimat die Fermente dauernd zerstört oder nur seine Gegenwart die Fermentwirkung hindert, muß man aus dem unwirksam gewordenen Sublimatfermentgemische das Sublimat entfernen oder in eine unschädliche Form umsetzen. Hierfür kommen zwei Gruppen von chemischen Mitteln in Frage. Die eine ist diejenige, welche das Quecksilber in eine unlösliche Verbindung umsetzt. Von dieser Gruppe benutzte ich Schwefelkalium bei meinen Untersuchungen. Die andere wandelt das Mercurisalz zu einem zwar löslichen, aber nicht mehr dissoziierbaren Salz um. Diese Gruppe wurde durch Cyankalium vertreten.

Bevor die Versuche mit Fermentlösungen in Angriff genommen wurden, war die Kenntnis des Bindungsverhältnisses zwischen Sublimat und diesen Mitteln in einfacher wässeriger Lösung eine wichtige Vorbedingung. In allen Versuchen wurde das Sublimat stets in 1%iger Lösung angewandt. Wenn das Schwefelkalium chemisch rein wäre, und die Umsetzung zwischen beiden Salzen genau nach der Gleichung $mHgCl_2 + mK_2S = mHgS + 2mKCl$ vollkommen von statten gehen würde,

so müßte 1 ccm von 1 $^0/_0$iger $HgCl_2$-Lösung durch 0,74 ccm von 1 $^0/_0$iger K_2S-Lösung gänzlich ausgefällt werden, wie es nach dem Verhältnisse der Molekulargewichte beider Verbindungen, $HgCl_2 : K_2S(H_2O_5) = 270{,}9 : 200{,}36 = 1 : 0{,}7396$, sich erwarten läßt. Das wirkliche Verhältnis war nicht so einfach, weil einmal unser K_2S-Präparat nicht ganz rein war und wieder die chemische Umsetzung nicht so vollkommen vor sich ging. Um das richtige Mengenverhältnis, bei dem die beiden Salze ganz äquivalent gegeneinander stehen, zu finden, verfuhr ich folgendermaßen: Zu einem Volumen der genannten $HgCl_2$-Lösung setzte ich verschiedene Volumen (von 0,73 bis 0,9) von 1 $^0/_0$iger K_2S-Lösung. Nach 30 Minuten filtriert man wiederholt, das klare Filtrat wird in drei Teile geteilt. Zum ersten Teile wird ein Tropfen Phenolphthalein, zum zweiten ein Tropfen $HgCl_2$, zum dritten K_2S zugesetzt. Wenn im ersten Röhrchen eine Rötung und im zweiten eine sofortige Trübung hervortritt, so ist es ein sicheres Zeichen von Überschuß der K_2S-Menge. Wenn dagegen in der dritten Probe eine sofortige dunkle Trübung erscheint, so verrät sich der Überschuß von $HgCl_2$ in dem Gemische. In dem Fall, wo die beiden Salze genau in äquivalenten Mengen zusammengetroffen sind, zeigt das erste Röhrchen erst nach Zufügung von noch einigen Tropfen K_2S Rötung, während die beiden anderen erst klar bleiben, um dann nach ein paar Minuten allmählich anzufangen, sich zu trüben. Nach dieser ziemlich umständlichen Prüfung wurde bestimmt, daß das Verhältnis zwischen $HgCl_2$ und unserem K_2S-Präparate 1 : 0,82 war, daß nämlich 0,82 Volumen von 1 $^0/_0$iger K_2S-Lösung oder 1 Volumen von 0,82 $^0/_0$iger Lösung einem Volumen 1 $^0/_0$iger $HgCl_2$-Lösung eben äquivalent waren. Daß selbst bei dem Fall, wo die beiden Salze in diesem optimalen Verhältnisse zusammentreffen, eine vollkommene Fällung des Quecksilbers nicht zu erreichen ist und eine kleine Spur davon in der Lösung bleibt, ist aus dem eben erwähnten Vorversuch zu ersehen. Ferner zersetzt sich die K_2S-Lösung beim Stehen an der Luft sehr leicht und schnell. Daher bereitete ich immer direkt vor dem Versuche eine frische Lösung, und zwar in einer Konzentration von 0,41 $^0/_0$. Zwei Volumen von dieser Lösung sind imstande, ein Volumen der $HgCl_2$-Lösung zu neutralisieren. Bei dem Vorversuche mit Cyankalium war die Sache ganz einfach. Nach der Gleichung $HgCl_2 + 2\,KCN = Hg(CN)_2 + 2\,KCl$ und dem Verhalten der Molekulargewichte $270{,}9 : 130{,}3 = 1 : 0{,}48$ wurde 1 ccm von 1 $^0/_0$iger $HgCl_2$-Lösung durch 0,48 ccm von 1 $^0/_0$iger KCN-Lösung eben neutralisiert. Die Neutralisierung kann man durch Titrierung mit Phenolphthalein als Indicator ganz einfach beweisen.

In den Versuchen mit Fermentlösung muß man ein solches Mittel auswählen, welches nicht nur zunächst das Quecksilber in eine unwirksame Form überführt, sondern auch bei nachheriger Untersuchung der Fermentkraft dasselbe in derselben Form beläßt und gleichzeitig die Untersuchungsmethode selbst nicht stört. Zum Beispiel ist für den Versuch mit

a) Pepsin

keines von den oben genannten zwei Mitteln geeignet. Wenn man zu einer Pepsinsublimatmischung eine gerade passende Menge von KCN zusetzt, dann wird das Quecksilber wohl zunächst in das unwirksame $Hg(CN)_2$ umgesetzt und die Aktivität des Pepsins vielleicht wiederhergestellt. Bei nachheriger Untersuchung hat man aber die Salzsäure zuzusetzen, und dadurch wird das Quecksilber nochmals ionisiert. Mit K_2S geht der Versuch auch nicht, weil der nach der Neutralisation noch in der Lösung spurweise zurückbleibende Schwefel nach und nach sich abscheidet und Trübung der Flüssigkeit hervorruft, welche natürlich das Resultat der Aufklärungsmethode undeutlich macht. Noch ein wichtiger Grund für das Mißlingen des Versuchs wird weiter unten erörtert werden.

b) Trypsin.

Aus demselben Grund paßt hier K_2S auch nicht. Durch KCN kann man aber die Reaktivierung des Trypsins nachweisen. In dem ersten Teil dieser Arbeit wurde mitgeteilt, daß 1 ccm einer 1 $^0/_{00}$igen Trypsinlösung durch 1 ccm $HgCl_2$-Lösung schon seine Wirkung einbüßt. Um die Trypsinwirkung ganz sicher aufzuheben, nahm ich die doppelte Menge von Sublimat. Der Versuch wurde also folgendermaßen angestellt: Zu einem Volumen 1 $^0/_{00}$iger Trypsinlösung werden zwei Volumen 1 $^0/_0$iger $HgCl_2$-Lösung zugesetzt. Nach einer Stunde setzt man dazu 0,97 Volumen von 1 $^0/_0$iger KCN-Lösung und füllt dann mit 0,03 Volumen Wasser auf, so daß das Endvolum gerade das Vierfache des Ausgangsvolumens beträgt. Mit einer Reihe von absteigenden Mengen einer derartigen Mischung stellt man die Verdauungsversuche der Caseinlösung an. Als Kontrolle dient die entsprechende Menge der nicht behandelten Fermentlösung, einmal ohne Zusatz, ferner mit Zusatz von je 0,05 ccm KCN, dann mit Zusatz von Sublimat. In allen folgenden Tabellen wird die Fermentmenge jedes Röhrchens auf den originalen Gehalt umgerechnet angegeben werden. Es ist daher selbstverständlich, daß in dem eben erwähnten Fall, wo durch das Reaktivierungsverfahren das Volumen vierfach vergrößert ist, statt 0,5, 0,2 ccm usw. 2,0, 0,8 ccm usw. gebraucht werden mußten.

Tabelle XVIII.

Trypsinmenge (1 : 1000) in ccm		Originale Trypsinlösung		Trypsin 1,0 Sublimat 2,0	Tryps. 1,0 Subl. 2,0 nach 1 St. KCN 0,97 H_2O 0,03
		ohne Zusatz	mit je 0,05 ccm KCN		
0,7	Mit Wasser auf 2 ccm aufgefüllt + 2 ccm Casein	+	+	—	
0,5		+	+	—	+
0,2		+	+	—	+
0,1		+	+		+
0,05		±	±		±
0,02		—	—		—
0,01		—	—		—
0		—	—		—

Wie diese Tabelle zeigt, ist KCN imstande, die durch Sublimat gehemmte Trypsinwirkung fast vollkommen wieder hervorzurufen. Ferner übt das Mittel an sich keine schädliche Wirkung auf das Ferment aus, wenigstens nicht bei der untersuchten Menge von 0,05 ccm einer 1 %igen Lösung.

c) Lab.

Beim Labferment liegt die Sache etwas anders, da nämlich das KCN allein die Labwirkung sehr bedeutend schädigt.

Tabelle XIX.

Labmenge in Gramm		Labung der 5 ccm Milch mit		
		Lab allein	Lab mit Zusatz von 0,05 ccm 1 % KCN	Lab mit Zusatz von 0,01 ccm 1 % KCN
0,00005	Mit 0,85 %iger NaCl auf 2 ccm aufgefüllt	+	—	
0,00003		+	—	—
0,00002		+	—	—
0,000015		+	—	—
0,00001		—	—	—
0,000007		—	—	—
0		—	—	—

Ob diese Schädigung durch die Alkalescenz des Salzes oder durch HCN selbst bedingt ist, soll vorläufig dahingestellt bleiben. Jedenfalls muß man zum Reaktivierungsversuche ganz genau

äquivalente Mengen von KCN und Sublimat gegeneinander wirken lassen. Mit Berücksichtigung dieser Bedingung geschah die Reaktivierung der Labwirkung leicht und beinahe quantitativ vollkommen, wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle XX.

Labmenge in Gramm	Nicht behandelte Lablösung 1/10 ‰	1/10 ‰ Lab 1,0 1 % $HgCl_2$ 0,5 H_2O 0,5	1/10 ‰ Lab 1,0 1 % $HgCl_2$ 0,5 nach 1 St. 1 % KCN 0,24 H_2O 0,26
0,0001		—	+
0,00007		—	+
0,00005	+	—	+
0,00003	+		+
0,00002	+		+
0,000015	+		+
0,00001	+		±
0,000007	—		—
0,000005	—		—
0	—		—

Ferment auf 2 ccm aufgefüllt + 5 ccm Milch

Das K_2S schädigt ebenfalls die Labwirkung. Mit diesem Mittel gelang es mir niemals, die Reaktivierung zu erzielen. Da durch KCN diese so leicht gelungen war, so habe ich diese Versuche in verschiedenen Mengenverhältnissen von Sublimat und K_2S wiederholt angestellt. Alle Bemühungen ließen mich aber im Stich. Der Grund der ganz abweichenden Resultate der Versuche mit beiden Mitteln ist mir noch nicht klar; es ist möglich, daß das Lab mit dem Niederschlag des HgS mitgerissen wird, wovon noch unten bei anderen Fermenten die Rede sein wird.

d) Speicheldiastase.

Mit diesem Ferment gelang der Reaktivierungsversuch sehr leicht, und zwar sowohl durch Schwefelkalium wie auch durch Cyankalium. Kleine Mengen von K_2S haben fast keinen Einfluß auf die diastatische Fermentwirkung. Dagegen übt das Cyankalium schon in geringer Menge starke Hemmung aus.

Tabelle XXI.

Speichelmenge in ccm	Speichel ohne Zusatz	Mit je 0,05 ccm 0,41 %iger K_2S-Lösung	Mit je 0,05 ccm 1 %iger KCN-Lösung
0,025	+	+	—[1]
0,016	+	+	—
0,01	+	+	—
0,0064	+	+	—
0,004	+	±	—
0,0025	—	—	—
0,0016	—	—	—

Nachdem es sichergestellt war, daß 1 ccm Speichel durch 0,1 ccm einer 1 %igen $HgCl_2$-Lösung stets seine Wirkung vollkommen einbüßt, setzte ich zu 1 ccm Speichel 0,2 ccm Sublimatlösung und nach einer Stunde 0,4 ccm von 0,41 %iger K_2S-Lösung zu. Darauf wurde das Gemisch mit Wasser zu einem gleichen Volumenverhältnisse wie der Kontrollspeichel gebracht.

A. Speichel 1 ccm + Wasser 9 ccm . . . . . . = 10 ×
B. „ 1 „ + 1 % $HgCl_2$ 0,2 ccm
+ H_2O 8,8 ccm . . . . . . = 10 ×
C. „ 1 „ + 1 % $HgCl_2$ nach 1 Std. + 0,41 %
K_2S 0,4 ccm + H_2O 8,4 ccm . = 10 ×

Die vergleichende Untersuchung der diastatischen Kraft dieser drei Speichelverdünnungen ergab die folgenden Resultate.

Tabelle XXII.

Speichelgehalt in ccm	A	B	C
0,1		—	
0,064		—	
0,04		—	
0,025	+		+
0,016	+		+
0,01	+		+
0,0064	+		+
0,004	+		+
0,0025	—		—

[1]) Hier muß man mehrere Tropfen Jodlösung zusetzen, weil die beim ersten Tropfen eintretende Blaufärbung bald wieder verschwindet, beim Zusatz von 4 bis 5 Tropfen bleibt die Färbung aber bestehen.

Es wurde also die durch Sublimat ganz gehemmte Wirkung des Speichels durch K_2S quantitativ vollkommen wieder hervorgerufen. Hierbei könnte vermutet werden, daß die Beförderung der Speichelwirkung durch das bei der Umsetzung neu entstandene KCl diese Reaktivierung vortäuscht. Wie schon lange bekannt und neulich von Wohlgemuth durchaus bestätigt worden ist, hat das Cl-Ion eine beträchtliche befördernde Wirkung auf den diastatischen Vorgang. Aber in meinem Fall ist die entstehende KCl-Menge ganz gering, und der Speichel wird noch 100 fach verdünnt.

Außerdem ist der Einfluß des Cl-Ions bei einer einstündigen Fermentwirkung noch nicht so bedeutend, während er bei einer 24 stündigen Digestion schon sehr groß ist, wie der folgende Versuch es zeigt.

Tabelle XXIII.

Speichelmenge	Speichel mit Wasser verdünnt und aufgefüllt nach		Speichel mit 0,85 % NaCl verdünnt und aufgefüllt nach	
	1 Std.	24 Std.	1 Std.	24 Std.
0,01	+		+	
0,0064	+		+	
0,004	—	+	+	
0,0025	—	+	—	+
0,0016	—	—	—	+
0,001		—		+
0,00064		—		+
0,0004		—		+
0,00025		—		+
0,00016				+
0,0001				—

Bei einer einstündigen Verdauung, welche ich immer in meinen Versuchen gebrauchte, ist also der Unterschied der Kraft des mit Wasser und mit 0,85 % NaCl verdünnten Speichels gering. Aus diesen beiden Gründen ist der oben erhobene Einwand nicht stichhaltig.

Wenn wir nun nach dem K_2S-Zusatz den Niederschlag von HgS durch Filtrierpapier abfiltrierten, so zeigt das Filtrat eine nur wenig geringere Wirkung als der Kontrollspeichel.

Tabelle XXIV.

A. Speichel 1,0 + H_2O 9,0 ccm . . . . = 10 ×
B. „ 1,0 + 1% $HgCl_2$ 0,4 + H_2O 8,6 ccm . . . . . = 10 ×
C. „ 1,0 + 1% $HgCl_2$ 0,4 + 0,41% K_2S 0,8 ccm + H_2O 7,8 ccm . . . . = 10 ×
D. Ganz wie C, wurde aber nachher zentrifugiert und filtriert = 10 ×

Speichelmenge in ccm	A	B	C	D
0,2	+	—	+	+
0,1	+	—	+	+
0,05	+	—	+	+
0,02	+		+	+
0,01	+		+	+
0,0064	+		+	±
0,004	±		±	—
0,0025	—		—	—
0,0016	—		—	—

Vergleicht man die beiden Versuche (Tabelle XXIII und XXIV), so scheint die Menge des Sublimates gleichgültig bezüglich des Endresultates zu sein, wenn sie durch die entsprechende Menge von K_2S genau neutralisiert wird. Dies ist aber nicht immer der Fall. Wenn man mit einer großen Menge, zum Beispiel 1:1 Volumen 1%iger Sublimatlösung den Speichel behandelt, so geschieht die Reaktivierung nicht mehr vollständig. Wenn besonders der mit einer großen Menge Sublimat behandelte Speichel nach der Neutralisation durch K_2S filtriert wird, dann zeigt das Filtrat bedeutend schwächere Wirkung. Der Unterschied der Kraft von filtriertem und nicht filtriertem Speichel steigt mit der Menge des Sublimates an, womit der Speichel vorbehandelt war. Wie oben beim Vorversuch mit wässerigen Lösungen von Sublimat und Schwefelkalium gesehen wurde, ist die Fällung des Quecksilbers nicht vollständig, sondern es bleibt in der Lösung eine Spur sowohl von Hg als auch von S. Dieser nicht fällbare Teil des Hg wird mit wachsender Sublimatmenge zunehmen. Ferner wird das Ferment durch ausfallendes HgS etwas mitgerissen. Aus diesen beiden Gründen sind die oben beschriebenen Versuchsresultate wohl erklärlich.

Wenn zu einem Speichel das Sublimat zugesetzt wird, so entsteht mit der Zeit ein Niederschlag von koaguliertem Schleim.

Zentrifugiert man den Niederschlag ab und filtriert die Flüssigkeit durch gehärtetes Papier, so zeigt das Filtrat nach der Neutralisation mit K_2S viel schwächere Wirkung als der Kontrollspeichel; dabei zeigt der Niederschlag nach wiederholtem Waschen mit Wasser und der Neutralisation mit K_2S auch eine schwache Wirkung, wie die folgende Tabelle es zeigt.

Tabelle XXV.

A. Speichel 1 ccm + Wasser 9 ccm . . . . = 10 fach
B. „ 1 „ + 1 % $HgCl_2$ 0,2 ccm + H_2O 8,8 ccm . = 10 fach
C. „ 1 „ + 1 % $HgCl_2$ 0,2 + 0,41 % K_2S 0,4 ccm + H_2O 8,4 ccm . . . . = 10 fach

Speichel 4 ccm + 1 % $HgCl_2$ 0,8 ccm wurde nach 1 Stunde zentrifugiert und filtriert. Davon

D. Filtrat 1,2 ccm + 0,41 % K_2S 0,4 ccm + H_2O 8,4 ccm . = 10 fach
E. Niederschlag 2 mal gewaschen und auf 4,8 ccm aufgefüllt + 0,41 % K_2S 1,6 ccm + H_2O 33,6 ccm = 10 fach

Speichelmenge in ccm	A	B	C	D	E
0,1		—			
0,05		—			
0,025	+		+	+	+
0,016	+		+	+	+
0,01	+		+	+	+
0,0064	+		+	+	—
0,004	+		+	—	—
0,0025	+		+	—	—
0,0016	—		—	—	—

Mit steigender Menge des zugesetzten Sublimates nimmt der Eiweißgehalt des Filtrates ab, aber es ist recht schwer, den Speichel durch $HgCl_2$ vollkommen eiweißfrei zu machen. Ein mit gleichem Volumen von der Sublimatlösung behandelter Speichel zeigte nach der Zentrifugierung und Filtration folgende Eiweißreaktionen:

Kochprobe: beim Kochen entstand eine leichte Trübung, wurde aber durch Zusatz von verdünnter Essigsäure wieder klar,

Essigsäure und Ferrocyankalium: negativ,

Biuretreaktion: negativ (wenn aber das Filtrat im Vakuum konzentriert wurde, zeigte es eine Andeutung der Violettfärbung),

Pikrinsäure: Spur Trübung,
Gerbsäure: „ „
Platinchlorid: „ „
Salzsäure und Quecksilberjoditjodkalium: Spur Trübung.

Dieses proteinarme Filtrat zeigte nach der Neutralisation mit K_2S noch schwächere Wirkung als das des letzten Versuchs. Die Wirkung war $^1/_8$ bis $^1/_{10}$ der Kraft des originalen Speichels. Daher ist es nicht unmöglich, durch Sublimat den Speichel von Eiweißkörpern, wenn auch nicht gänzlich, aber größtenteils zu befreien, mit relativ geringem Verlust von Fermentkraft. Dabei ist es aber notwendig und ziemlich schwierig, die geeignetste Sublimatmenge zu finden, wo trotz relativ kleinem Verlust an Ferment die Eiweißkörper doch ziemlich vollständig entfernt sind.

Während die Menge des Sublimats eine Bedeutung hat, scheint die Zeitdauer der Sublimateinwirkung ohne Belang zu sein. Von einem mit Sublimat 2 Tage lang behandelten Speichel konnte ich genau die gleiche Wirkung wie die des eine Stunde lang behandelten nachweisen.

Anhangsweise möchte ich hier einige Versuche mit Natronlauge erwähnen. Obwohl deren Resultate ganz negativ ausgefallen waren, mögen sie wohl von theoretischem Interesse sein. In der wässerigen Lösung wird $HgCl_2$ durch NaOH genau nach dem Verhalten der Molekulargewichte, $HgCl_2 = 2NaOH = 270{,}9:80 = 1:0{,}296$, neutralisiert, nämlich 1 ccm $1^0/_0$iger $HgCl_2$-Lösung ist zu 0,3 ccm $1^0/_0$iger NaOH- oder zu 0,75 ccm $^n/_{10}$-NaOH-Lösung ganz äquivalent. Beim Zusammentreffen der beiden Mittel in diesem Verhältnis wird das Quecksilber gänzlich ausgefällt, und die Lösung wird ganz klar und neutral. Als ich jedoch in einem Speichel die beiden Mittel in demselben Verhalten zusammenbrachte, wurde die Reaktion zwar neutral, aber die Flüssigkeit nicht ganz klar. Selbst nach einer kräftigen Zentrifugierung blieb der Speichel noch etwas trüb und zeigte keine diastatische Wirkung. Um zu sehen, ob das Enzym eventuell durch Alkali in dem Momente, wo NaOH zugesetzt war, vernichtet würde, stellte ich einen Versuch, und zwar mit verschiedenen Mischungen an, deren Wirkung in folgender Tabelle gezeigt wird.

Tabelle XXVI.

		Verdauung von 2 ccm 1 % iger Stärkelösung nach 1 Std. bei 38° durch folgende Mengen:						
		0,1	0,025	0,016	0,01	0,0064	0,004	0,0025
A. Originaler Speichel	Alle sind mit Wasser auf gleiches Volumen gebracht.		+	+	+	+	+	—
B. Speichel 1,0 + 1 % $HgCl_2$ 0,15		—						
C. B + 0,41 % K_2S 0,3			+	+	+	+	—	—
D. B + n/10-NaOH 0,12		—						
E. D wurde zentrifugiert und filtriert. Das Filtrat war nicht ganz klar		—						
F. E-Filtrat + n/10-HCl 0,05 (Spur sauer) .		—						
G. F + 0,41 % K_2S 0,3			+	+	—	—	—	—
H. E-Niederschlag, zweimal gewaschen, mit Wasser aufgeschwemmt + 1 Tropfen HCl + 0,41 % K_2S 0,2			+	+	—	—	—	—

Dieser Versuch zeigt, daß die Diastase durch das Alkali nicht vernichtet wird und in einem Medium, in dem $Hg(OH)_2$ sich befindet, noch mit Quecksilber verbunden vorhanden ist, ganz gleich wie in einer $HgCl_2$-Lösung. Diese Verbindung von Quecksilber und Ferment befindet sich sowohl in dem Niederschlag als auch in dem noch suspendierten $Hg(OH)_2$ und wird durch K_2S wieder befreit werden.

Die Entgiftung durch KCN geschah auch in gleicher Weise, wie es mit K_2S der Fall war. Ein Beispiel hierfür wird in folgender Tabelle ersichtlich gemacht.

Die weiteren Versuchsresultate decken sich mit den K_2S-Versuchen im allgemeinen. Ich unternahm aber nicht mit KCN die Reinigung des Speichels, weil hier das Mercuricyanid in der Lösung bleibt und dadurch das Ferment schon verunreinigt wird.

Tabelle XXVII.

Speichelmenge in ccm	Speichel, nicht behandelt	Speichel 1,0 1% Sublimat 0,5	Speichel 1,0 1% $HgCl_2$ 0,5 1% KCN 0,24	Speichel 1,0 1% $HgCl_2$ 0,5 filtriert. 1% KCN 0,24
1,0		—		
0,04				+
0,025	+		+	+
0,016	+		+	+
0,01	+		+	+
0,0064	+		+	±
0,004	+		+	—
0,0025	+		±	—
0,0016	—		—	—

e) Proteolytisches Ferment der Leber.

Aus dem oben bei dem Pepsinversuche erwähnten Grunde gelang die Reaktivierung des Leberfermentes durch KCN nicht, weil hier auch Salzsäure zum Nachweis der Wirkung gebraucht werden muß. Dagegen wurde der Zweck mit K_2S ganz leicht erreicht. Kleine Mengen von K_2S sind fast ohne Einfluß auf die gelatinolytische Fermentwirkung, zeigten aber manchmal eine geringe Förderung derselben.

Tabelle XXVIII.

Menge von Leberextrakt	Extrakt allein nach		Mit je 0,5 ccm 0,41%iger K_2S nach		Mit je 1 ccm 0,41%iger K_2S nach	
in ccm	6 St.	12 St.	6 St.	12 St.	6 St.	12 St.
0,7	+		+		+	
0,6	+		+		+	
0,5	+	+	+	+	+	+
0,4	±	+	+	+	+	+
0,3	—	+	±	+	±	+
0,2	—	—	—	—	—	—

Diese fördernde Wirkung ist vielleicht nicht dem Schwefel, sondern wahrscheinlichst der Veränderung der freien H-Ionenzahl zuzuschreiben, weil ein Teil nachher zugesetzter HCl zu etwas schwerer dissoziierbarem H_2S sich umsetzt, ferner die Menge von 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl-Lösung nicht die optimale Acidität

ist. Jedenfalls ist diese Steigerung der Fermentwirkung so geringfügig, daß sie gar nicht imstande ist, die Resultate der Reaktivierungsversuche vortäuschen zu können.

Wir wissen schon, daß 1 ccm unseres Leberextraktes durch 0,03 ccm 1%iger $HgCl_2$-Lösung vollkommen inaktiviert wird. Zum Reaktivierungsversuche wurde stets mehr als das Zweifache von dieser eben inaktivierenden Dose von Sublimat gebraucht. So einmal ganz inaktiviertes Ferment wurde durch die passende Menge von K_2S wieder vollkommen reaktiviert, wie aus folgender Tabelle zu ersehen ist.

Tabelle XXIX.

Menge des Leberextraktes in ccm	Extrakt 4,0 Wasser 1,0 nach 6 St.	12 St.	Extrakt 4,0 1% $HgCl_2$ 0,3 Wasser 0,7 nach 6 St.	12 St.	Extrakt 4,0 1% $HgCl_2$ 0,3 nach 1 St. 0,41% K_2S 0,6 Wasser 0,1 nach 6 St.	12 St.
1,0	+		—	—	+	
0,7	+		—	—	+	
0,6	+				+	
0,5	+				+	
0,4	±	+			±	+
0,3	—	+			—	+
0,2	—	—			—	—

Im Gegensatz zum Speichel kann man nach der Neutralisation den HgS-Niederschlag abzentrifugieren und abfiltrieren, ohne dabei den geringsten Verlust an Wirksamkeit des Filtrates zu haben. Setzt man zum Leberextrakt die Sublimatlösung zu, so tritt eine Trübung hervor, darauf beginnt eine bedeutende Menge von Niederschlag sich abzusetzen. Selbst wenn man diesen Niederschlag vor der Neutralisation mit K_2S abzentrifugiert, so geht die Wirksamkeit doch nicht verloren, wie die folgende Tabelle zeigt.

Wir sehen hier also einen scharfen Gegensatz zwischen dem Speichel und Leberextrakt. Die Diastase wird durch den Quecksilberniederschlag leicht aus der Lösung gerissen, während das Leberferment in der Lösung bleibt. Dieser Gegensatz ist aber nur ein scheinbarer. Wenn wir die Menge des Sublimats noch weiter vergrößern, wird auch das Leberferment von dem Nieder-

Tabelle XXX.

Menge des Leberextraktes	Leberextrakt 2,0 H_2O 1,0 nach		Extrakt 4,0 1% $HgCl_2$ 0,4 H_2O 1,6 nach	Extrakt 4,0 1% $HgCl_2$ 0,4 nach 1 St. zentrifugiert, filtriert; davon Filtrat 2,2 0,41% K_2S 0,4 H_2O 0,4 wieder zentrifugiert nach	
in ccm	6 St.	12 St.	12 St.	6 St.	12 St.
1,0			—		
0,7			—		
0,6	+			+	
0,5	+			+	
0,4	+	+		+	+
0,3	+	+		±	+
0,2	—			—	—

schlag allmählich mitgerissen. Bis zu einem Verhältnis von 1 Volumen Extrakt zu 0,5 Volumen Sublimatlösung wurde die Fermentwirkung quantitativ in der Lösung erhalten, aber bei dem Versuche, wo die Sublimatmenge dem Volumen des Extrakts gleich war, ging ein Teil des Fermentes aus der Lösung verloren.

Der Eiweißgehalt des Leberextraktes ist so groß, daß beim einfachen Kochen ein bedeutendes Koagulat sich bildet. Mit $^1/_2$ Volumen Sublimatlösung behandeltes Extrakt hat schon einen großen Teil des Eiweißes verloren, während selbst das mit gleichem Volumen der Sublimatlösung behandelte Extrakt auch noch eine deutliche Eiweißreaktion zeigt. Daher kann von der vollkommenen Enteiweißung durch Sublimat keine Rede sein. Trotzdem kann das Sublimat zu dem Zwecke angewendet werden, ein sehr eiweißreiches Ferment, wie ein Organextrakt, von dem größten Teil der Proteine zu befreien, wenn man eine geeignete Sublimatmenge ausgesucht hat, wodurch möglichst viel Eiweißkörper mit relativ kleinem Verlust an Ferment entfernt werden. Bei meinem Leberextrakt lag die optimale Sublimatmenge in dieser Hinsicht zwischen $^1/_2$ bis 1 gegen 1 Volumen Extrakt.

Der Reaktivierungsversuch durch NaOH gab ein negatives Resultat, wie es auch beim Speichel der Fall war. Das weitere Verhalten des Leberfermentes zur Natronlauge war auch gleich wie das des Speichels. Das folgende Beispiel zeigt das Verhalten.

Tabelle XXXI.

	Verflüssigung von 2 ccm 5%iger Gelatinelösung nach 6 Stunden bei 38° durch folgende Mengen						
	1,0	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
A. Das Leberextrakt			+	+	±	—	—
B. Extrakt 1,0 + 1% $HgCl_2$ 0,1 . .	—	—					
C. B + 0,41% K_2S 0,2			+	+	±	—	—
D. B + $^n/_{10}$-NaOH 0,08	—	—					
E. D wurde zentrifugiert und filtriert. Das Filtrat war opalescent . . .	—	—					
F. E-Filtrat + $^n/_{10}$-HCl 0,04 (reagiert schwach sauer)	—	—					
G. F + 0,41% K_2S 0,2		+	+	+	±	—	—
H. E-Niederschlag wurde zweimal gewaschen, mit Wasser aufgeschwemmt, + 1 Tropfen HCl + 0,41% K_2S 0,2	—	—					

Vergleicht man diese Tabelle mit der Tabelle XXVI, so findet man nur in G. und H. eine Abweichung. Das erklärt sich aus dem Unterschied der Fällbarkeit beider Fermente, die schon oben erwähnt wurde.

Werfen wir nun einen Rückblick auf die bisherigen Untersuchungen mit verschiedenen Fermenten, so lassen sich die Resultate folgendermaßen zusammenfassen.

1. Bei Fermenten, wie Trypsin und Lab, welche in sehr eiweißarmen Lösungen zur Untersuchung gelangen und erst durch große Mengen von Sublimat inaktiviert werden, ist die Reaktivierung nur durch KCN möglich, wobei kein Niederschlag sich bildet. Dagegen geschieht sie nicht durch K_2S, welches das Quecksilber ausfällt.

2. Bei dem relativ eiweißarmen und durch eine geringe Menge von Sublimat leicht inaktivierbaren Speichel geschieht die Reaktivierung sowohl durch KCN als auch durch K_2S ganz leicht. Durch Abzentrifugieren des durch $HgCl_2$ erzeugten Niederschlages geht aber ein bedeutender Teil des Fermentes aus der Lösung in den Niederschlag über.

3. Bei eiweißreichem Leberextrakt ist die Reaktivierung durch die beiden Mittel noch viel leichter zu erreichen. Der Übergang des proteolytischen Fermentes aus der Lösung in den Niederschlag ist bei weit größerer Menge von Sublimat zu bemerken.

4. In fast eiweißfreier Enzymlösung ruft der Zusatz einer zur Inaktivierung nötigen Sublimatmenge keine Trübung hervor. In proteinhaltigen Fermentlösungen, wie Speichel und Leberextrakt, tritt bei demselben Zusatz eine Trübung, ja sogar ein bedeutender Niederschlag auf. Wenn der Eiweißgehalt gering ist, so geht ein Teil des Fermentes bei Zentrifugierung in den Niederschlag über. Wenn aber die Eiweißmenge sehr groß ist, so bleibt das ganze Ferment in der Lösung. Erst bei sehr großer Sublimatmenge geht ein Teil des Ferments in den Niederschlag über.

Überblickt man diese Tatsachen, ist man wohl zu der Annahme berechtigt, daß das Sublimat zuerst die Eiweißkörper, soweit sie vorhanden sind, angreift und dann ausfällt und dann, wenn das Medium eiweißarm wird, das Ferment in einen durch Fällungsmittel leicht mitzureißenden Zustand verändert. Mit anderen Worten: das Ferment ist durch Sublimat schwerer fällbar als die Eiweißkörper. Ferner ist die Inaktivierung und die Fällung oder besser Zustandsänderung des Ferments durch Sublimat nicht derselbe Vorgang. Das Mißlingen der Reaktivierung des Pepsins, Trypsins und Labs durch K_2S hat aber einen Grund darin, daß die relativ große Sublimatmenge, die zur Inaktivierung nötig ist, gleichzeitig zur Zustandsänderung des Ferments ausreicht, desto mehr, weil da fast kein Eiweiß vorhanden ist. Infolgedessen wird das Ferment durch den HgS-Niederschlag sehr leicht mitgerissen. Ob diese Anschauung das Richtige trifft, wird erst durch weitere Untersuchungen entschieden werden.

f) H_2O_2 zersetzendes Ferment.

Als Katalase wurde dasselbe Leberextrakt, welches bei den vorigen Versuchen als proteolytisches Ferment gebraucht war, angewandt. Dieses Extrakt hat ungemein starke Katalase-Wirkung. Um diese Wirkung zu sistieren, muß man etwa das 50fache Volumen $1\,^0/_0$iger $HgCl_2$-Lösung einwirken lassen. Eine

10fache Verdünnung war also für unseren Versuch zweckmäßiger als das konzentrierte Extrakt. Zur Inaktivierung der Katalase von 1 ccm dieser Verdünnung waren 5 ccm 1°/₀iger $HgCl_2$-Lösung nötig, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle XXXII.

Extraktmenge (1:10) in ccm	Sublimatmenge (1:100) in ccm	H_2O_2 10 Vol.-°/₀	Sauerstoffentwicklung
1,0	0,3	1,3	stark
1,0	0,5	1,5	,,
1,0	1,0	2,0	schwach
1,0	2,0	3,0	,,
1,0	3,0	4,0	,,
1,0	4,0	5,0	Spur
1,0	5,0	6,0	0

Beim Reaktivierungsversuche wurden daher 5 ccm der $HgCl_2$-Lösung zu 1 ccm der Extraktverdünnung zugesetzt. Nach einer Stunde wurde mit 2,4 ccm 1°/₀iger KCN-Lösung neutralisiert und mit 1,6 ccm Wasser auf eben 10 ccm aufgefüllt, um gerade die 100fache Verdünnung zu erreichen. Kontrollextrakte wie auch diese Verdünnung wurden weiter mit Wasser mehrfach verdünnt. Von allen diesen Verdünnungen werden je 2 ccm entnommen, dazu 2 ccm einer H_2O_2-Lösung (Volumen-°/₀ = 10) zugesetzt. Nach gutem Durchschütteln werden dann die Röhrchen ruhig stehen gelassen. Die Grenze der Verdünnungen, wo die Sauerstoffentwickelung nicht mehr sichtbar wird, gibt eine Orientierung der katalytischen Kraft der untersuchten Lösungen.

Obwohl mit solcher einfachen Versuchsmethode eine quantitative Bestimmung der katalytischen Kraft natürlich unmöglich ist, kann man doch aus dem Resultate eine Reaktivierung der katalytischen Kraft entnehmen. Das Enzym scheint durch Sublimat größtenteils ausgefällt zu werden. Da das Extrakt 10fach verdünnt und eiweißarm geworden ist und die Menge des Sublimats eine ungeheuere ist, ist die Ausfällung des Ferments zu erwarten. Aus demselben Grund gelang es mir niemals, das inaktivierte Ferment durch K_2S zu reaktivieren, trotz der Unschädlichkeit dieses Mittels selbst auf das kata-

Tabelle XXXIII.

Leberextrakt von den Verdünnungen	Extrakt nicht behandelt	$^1/_{10}$ Extrakt 1,0 1% $HgCl_2$ 5,0 H_2O 4,0	$^1/_{10}$ Extrakt 1,0 1% $HgCl_2$ 5,0 nach 1 St. 1% KCN 2,4 H_2O 1,6	$^1/_{10}$ Extrakt 1,0 + 1% $HgCl_2$ 5,0 zentrifugiert	
				Obere Flüssigkeit mit KCN neutralisiert	Niederschlag mit Wasser gewaschen und mit KCN neutralisiert
100 ×		—		Spur?	stark
200 ×				—	schwach
500 ×			stark	—	„
1000 ×	stark		„	—	Spur
2000 ×	„		schwach	—	„
3000 ×	„		„		—
5000 ×	„		„		—
10000 ×	schwach		„		—
20000 ×	„		Spur		—
30000 ×	Spur		—		—
50000 ×	—?		—		—

lytische Ferment im Gegensatz zum KCN, welches bekanntlich eine vorübergehende Hemmung ausübt.

Schluß.

1. Das Sublimat hemmt die Tätigkeit der untersuchten Fermente, des Pepsins, Trypsins, Labs, Speichels, proteolytischen Fermentes der Leber und der H_2O_2 zersetzenden Fermente.

2. Niemals wurde eine sichere Förderung der Fermentwirkung durch Sublimat nachgewiesen.

3. Die durch Sublimat gehemmte Fermentwirkung wird durch geeignete Mittel, welche das Quecksilber aus der Lösung niederzuschlagen oder in eine nicht dissoziierbare Verbindung umzusetzen imstande sind, wieder hervorgerufen.

4. Die Fermente sind durch Sublimat schwerer fällbar als die begleitenden Eiweißkörper. Daher ist es möglich, ein eiweißreiches Fermentpräparat durch Sublimat bis zu einem gewissen Grad von den Eiweißkörpern zu befreien. Das in der Lösung neben dem Fermente zurückbleibende Sublimat wird nachher durch Fällungsmittel, wie K_2S entfernt, damit das Ferment selbst wieder reaktiviert wird.

Über den Einfluß des elektrischen Stromes auf die Enzyme.

Von

A. v. Lebedew, Moskau.

(Eingegangen am 8. März 1909.)

Die Studien über den Einfluß von Gleich- und Wechselströmen auf die Enzyme (Diastase) und entsprechend wirkende anorganische Katalysatoren (HCl, H_2SO_4, HNO_3) wurden von mir schon im Jahre 1905 begonnen, und ein Teil derselben ist in dieser Zeitschrift veröffentlicht.[1]) Dabei habe ich ausdrücklich gesagt, daß ich diese Versuche fortzusetzen beabsichtige[2]), und jetzt nehme ich anläßlich der Arbeiten von Leonor Michaelis [Elektrische Überführung von Fermenten. I. Das Invertin][3]) und F. Kudo [Über den Einfluß der Elektrizität auf die Fermente][4]) die Gelegenheit wahr, es noch einmal zu wiederholen.

Auf die von oben genannten Autoren erhaltenen Resultate werde ich in einer später erscheinenden Arbeit zurückkommen.

---

[1]) Diese Zeitschr. 11, 392, 1908. Diese Versuche sind auch erwähnt in meiner bereits vor Jahresfrist erschienenen Arbeit über den Einfluß der Wechselströme auf kolloidales Platin (Bull. de la Soc. Ch. de France. [4] 3, 56, 1908).

[2]) Diese Zeitschr. 11, 396 u. 402, 1908.

[3]) Diese Zeitschr. 16, 81, 1909.

[4]) Diese Zeitschr. 16, 233, 1909.

Untersuchungen über das Vorkommen von Phosphatiden in vegetabilischen und tierischen Stoffen.

Von

Hans Vageler.

(Aus dem agrikultur-chemischen Institut der Universität Königsberg.)

(Eingegangen am 14. März 1909.)

Der Begriff „Phosphatid" ist in neuerer Zeit von E. Schulze-Zürich für solche organische Verbindungen der Pflanzen und des Tierkörpers eingeführt, welche der Gruppe des Lecithins angehören, bzw. zu ihr in näheren Beziehungen stehen. Meist sind die Phosphatide wirkliche Lecithine, sie sind in der Literatur auch als solche bezeichnet. Da E. Schulze (19) aber nachwies, daß nicht immer das gegenseitige Verhältnis von P : N das gleiche wie beim Lecithin ist, dürfte es nicht mehr zulässig sein, sie kurzweg als Lecithine zu bezeichnen; sie enthalten zum Teil andere chemische Verbindungen, welche eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen P : N bedingen. So fanden Wintgen und Keller (50) in mehreren Lecithinpräparaten, die sie aus Sojabohnen und Eigelb darstellten, den Phosphorgehalt etwas niedriger, den Stickstoffgehalt dagegen etwas höher, als es der theoretischen Formel entsprach. Ebenso enthielten die Lecithinpräparate, welche Hiestand (51) aus verschiedenen pflanzlichen Substanzen darstellte, stets viel zu wenig Phosphorsäure. Dieser Mindergehalt an Phosphorsäure fand nur zum Teil darin eine Erklärung, daß, wie Hiestand nachwies, seine vermeintlichen Lecithinpräparate in Wirklichkeit Verbindungen von Lecithin mit Kohlenhydraten waren. Um den geringen Phosphorgehalt vollständig zu erklären, mußten nach Ansicht des Verfassers die dargestellten Präparate außer Cholin noch andere stick-

stoffhaltige Bestandteile enthalten. Über die chemische Konstitution dieser Bestandteile wissen wir bisher noch nichts.[1]) Auch ist uns nicht bekannt, ob derartige Verbindungen die gleiche physiologische Bedeutung für die Lebensvorgänge der Pflanzen und der Tiere besitzen wie das Lecithin.

Bevor wir hierüber nähere Forschungen ausführen können, müssen wir zunächst über das Vorkommen des Lecithins und lecithinähnlicher Verbindungen unsere Kenntnisse erweitern, dann Trennungsmethoden des Lecithins von anderen Phosphatiden auffinden, und dann erst werden wir die physiologischen Wirkungen dieser Phosphatide erproben können.

Meine Untersuchungen erstreckten sich auf das Vorkommen der in starkem Alkohol löslichen Phosphatide, zu denen insbesondere das Lecithin gehört.

Im ersten Abschnitt habe ich die bisher bekannten Eigenschaften des Lecithins kuz zusammengestellt; von anderen in Alkohol löslichen Phosphatiden wissen wir durch die Untersuchungen von E. Schulze bisher nur, daß sie ein von Lecithin abweichendes Verhältnis des N : P haben; da diese Phosphatide noch nicht rein hergestellt sind, so war bei dem Überblick über die bisherigen Untersuchungen bezüglich ihrer Eigenschaften nichts zu berichten.

Die bisher gebräuchlichen Methoden zur quantitativen Bestimmung der Phosphatide wurden einer Prüfung unterzogen. Hierbei ergab sich, daß das bisherige Verfahren zur Ermittelung des Gehaltes vegetabilischer und tierischer Stoffe an Lecithin mit einem Fehler behaftet ist, indem beim Trocknen der zu untersuchenden Substanzen die Phosphatide teilweise zersetzt werden.

Eine Anzahl vegetabilischer Stoffe habe ich, nach Feststellung der Methode in verschiedenen Vegetationsperioden untersucht, ferner gewisse animalische Stoffe unter wechselnden Verhältnissen.

1. Bisher bekannte Eigenschaften der Lecithine.

„Die Lecithine sind kolloidale, fettähnliche, doch in Wasser quellbare Substanzen, welche sich durch ihren Gehalt an Stick-

---

[1]) Hierüber ist von Hiestand schon kurz berichtet in der Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 20.

stoff und Phosphor auszeichnen." (1) In den Lecithinen ist das Cholin an einen Phosphorsäurerest gebunden, welcher andererseits mit Glycerin verbunden ist. Außerdem sind an das Glycerin noch zwei Säurereste geknüpft, welche entweder der Öl-, Palmitin- oder Stearinsäure oder auch einem Gemisch von zweien dieser Säuren angehören. Wenigstens haben Schulze (2) und Likiernik (3) in ihren Lecithinpräparaten sowohl Ölsäure wie feste Fettsäuren nachgewiesen. [Vgl. ferner Laves (4) und Ulzer-Klimont (5).] Legt man das Distearyllecithin zugrunde, so ergibt sich folgende Konstitutionsformel:

$$\begin{array}{l} CH_2—O—CO.C_{17}H_{35} \\ | \\ CH—O—CO.C_{17}H_{35} \\ | \\ CH_2—O—PO.OH—O—CH_2—CH_2.N(CH_3)_3.OH \end{array}$$

Nach Strecker (6) ist diese Verbindung als Cholinester aufzufassen. Die optische Aktivität des Lecithins beruht nach P. Mayer (8) auf der unsymmetrischen Anordnung der Säureradikale am Glycerinrest. Das gewöhnliche d-Lecithin geht beim Erhitzen unter Druck in die optisch inaktive Form über, welche man sich durch Vereinigung von gleichen Teilen d- und l-Lecithin entstehend denken kann. Aus der optisch inaktiven Form wird durch Lipase das l-Lecithin unverändert abgespalten, während die d-Komponente unter der Einwirkung des Fermentes in Fettsäuren und Glycerinphosphorsäure zerfällt. Verdünnte Säuren wirken auf Lecithin, seiner Natur als Ester entsprechend, nur sehr langsam ein unter Abspaltung von freier Phosphorsäure, von Basen wird es dagegen sehr schnell zerlegt in Cholin, glycerinphosphorsaure und fettsaure Salze (7). Im Wasser quillt es und läßt sich zu einer homogenen filtrierbaren Suspension verteilen, der nach Thudichum (9) die Eigenschaften einer kolloidalen Lösung zukommen (10, 11). Es löst sich leicht in Äther, Alkohol, Benzol und Ölen. Aus diesen Lösungen wird es durch alkoholisches salzsaures Platinchlorid und ebenso alkoholische Chlorcadmiumlösung gefällt (12). Ebenso wird es aus seinen Lösungen durch Wasser, Essigsäuremethylester (51) oder Aceton in Form einer gelblichen amorphen Masse niedergeschlagen, ein Verhalten, das von verschiedenen Forschern zu seiner Reindarstellung verwandt worden ist. P. Mayer (8) gelang es, eine

Verbindung von Lecithin und Traubenzucker herzustellen; diese Lecithinglucose wird aus der Lösung in Benzol durch Alkohol in gelblich-weißen Flocken ausgefällt und enthält 84,5 % Traubenzucker. Ehrenfeld (13) stellte Molybdänverbindungen des Lecithins dar.

2. Darstellung des Lecithins.

Die Reindarstellung des Lecithins gründet sich auf seine Löslichkeit in Äther, Alkohol usw. So stellte Otolski (14) Lecithin aus Knochenmark dar, indem er die Substanz mit 96 % Alkohol extrahierte, den Extrakt mit Äther behandelte und schließlich aus der ätherischen Lösung das Lecithin mit Aceton fällte. Ähnlich verfuhr Zuelzer (15) bei der Darstellung aus Gehirn und Eigelb. Strecker (6) behandelte Eidotter mit einer Mischung von Äther und Alkohol und fällte aus der Lösung das Lecithin als Lecithinchloroplatinat; durch Zerlegung des Platinsalzes mit H_2S und Behandlung des salzsauren Lecithins mit Ag_2O erhielt er reines Lecithin. Eine Darstellungsmethode aus pflanzlichen Stoffen liegt von Schulze (16, 3, 45) vor. Dieser extrahierte fein gemahlene Lupinen oder auch Wicken mit Alkohol, löste den Destillationsrückstand in Äther. Die ätherische Lösung wurde durch Schütteln mit Wasser, dem zur Beseitigung einer Emulsion etwas Kochsalz zugesetzt war, gereinigt und dann eingedunstet. Bergell (18) erhielt die reine Substanz durch Spaltung des Cadmiumdoppelsalzes mit Ammoncarbonat.

3. Die quantitative Bestimmung des Lecithins nach den bisher üblichen Verfahren.

Die Bestimmung des Lecithins erfolgt derart, daß man den Destillationsrückstand des alkoholisch-ätherischen Extraktes mit Soda und Salpeter zwecks Zerstörung der organischen Substanz in der Platinschale glüht und in der Schmelze auf gewöhnliche Art und Weise die Phosphorsäure durch Fällen mit Ammonmolybdat und weiter mit Magnesiamischung bestimmt. Aus der gefundenen Menge der Phosphorsäure berechnet man dann den Gehalt der Substanz an Lecithin unter Zugrundelegung des Distearyllecithins mit einem Phosphorgehalt von 3,84 %. Richtiger wäre es allerdings, den durchschnittlichen

Phosphorgehalt aller drei Arten von Lecithin, des Dioleil-, Dipalmityl- und Distearyllecithins, also 3,94 % zugrunde zu legen [Schulze (19)]. Voraussetzung bei dem ganzen Verfahren bleibt, daß durch den Alkohol resp. Äther außer Lecithin kein anderer phosphorhaltiger Bestandteil der Substanz gelöst wird. Anorganische Phosphate sind zwar nachgewiesenermaßen in absolutem Alkohol unlöslich; aber wir wissen nicht, ob nicht neben dem Lecithin noch andere phosphorhaltige organische Verbindungen im Pflanzen- oder Tierkörper vorkommen, die durch Alkohol gelöst werden könnten. Die neuesten Untersuchungen von Schulze (17) haben dies sogar wahrscheinlich gemacht. Daher schlägt letztgenannter Autor auch vor, die Umrechnung auf Lecithin ganz zu unterlassen und nur unter Angabe des gefundenen Phosphorgehaltes von in Alkohol löslichen Phosphatiden zu sprechen. [Vgl. auch Winterstein (20) und Erlandsen (39).] Über die Extraktionsdauer, welche zur Erschöpfung des Materials erforderlich ist, lauten die Angaben sehr verschieden. Nach Schulze (21, 19, 16, 22) genügt zweistündige Extraktion mit 60 bis 65° warmem Alkohol, wobei der Alkohol nach 1 Stunde gewechselt wird; großes Gewicht legt Schulze auf die feine Zerkleinerung des Materials. Bitto (23) verlangt 20 maliges Auskochen mit Methylalkohol. Durch Äther findet jedenfalls keine vollständige Lösung des Lecithins statt. Vielleicht findet sich in den Pflanzen ein Teil des Lecithins als schwerlösliches Lecithalbumin oder in tierischen Stoffen an Vitellin gebunden vor, Stoffe, aus denen es erst durch warmen Alkohol in Freiheit gesetzt werden kann [Manasse (24)].

4. Vorkommen.

Lecithin scheint in größerer oder geringerer Menge in fast allen tierischen und pflanzlichen Organismen vorzukommen. Untersuchungen über den Lecithingehalt im tierischen Organismus sind besonders von Nerking (25) angestellt worden.

In folgender Tabelle sind einige seiner Resultate wiedergegeben:

Lecithingehalt des Kaninchens 0,36 % vom Lebendgewicht.

Lecithingehalt des Igels 0,79 % vom Lebendgewicht.

Lecithingehalt der einzelnen Organe des Kaninchens, Katze und Igels in Prozenten des trocknen Organs.

	Kaninchen	Katze	Igel
Lunge	5,96	6,1	4,28
Herz	5,86	4,55	10,49
Gehirn	12,41	13,74	22,31
Rückenmark	35,18	26,20	18,19
Nieren	5,02	6,26	8,55
Milz	4,23	0,39	6,56
Augen	2,19	—	—
Leber	3,82	4,99	5,23
Magen	3,31	—	6,37
Darm	0,629	—	1,508
Blut	0,863	—	—
Muskeln	2,59	—	3,71
Knochen	0,271	—	0,871
Fell	0,480	—	0,585
Nebennieren	5,54	5,36	92,0
Hoden	3,39	—	11,27

Otolski (14) fand im Knochenmark des Pferdes 0,23 bis 0,13 °/₀ Lecithin. Glikin (26) untersuchte das Knochenmark verschiedener Tiere und auch des Menschen und konstatierte Abnahme des Lecithingehaltes mit zunehmendem Alter. So enthielt das Fett des Knochenmarkes an Lecithin in Prozenten:

Kalb	4,25	Rind	2,45
Fohlen	2,09	Pferd	1,45
Ferkel (20 bis 24 Stunden alt)	30,65	Schwein	2,34
Ferkel (6 bis 8 Wochen alt)	28,78		
Hammel (jünger)	5,10	Hammel (älter)	2,15
Hund (totgeboren)	37,7	Hund (älter)	3,06
Kind (7 Monate)	61,19	Mensch (älter)	2,40

Ferner fand derselbe Autor (27) einen besonders hohen Lecithingehalt bei solchen Tieren und Produkten solcher Tiere, die besonders hilflos auf die Welt kommen.

Lecithingehalt in der Trockensubstanz einer Katze	5,06 °/₀
dagegen eines Meerschweinchens	3,79 °/₀
im Dotter des Taubeneies	28,54 °/₀
im Dotter des Hühnereies	15,41 °/₀
im neugeborenen Nesthocker	8,18 °/₀

Untersuchungen über den Lecithingehalt des Eidotters liegen außerdem noch von Manasse (24) vor. Zahlreiche Untersuchungen sind über den Lecithingehalt der Milch angestellt worden. Schmidt-Mühlheim (28) fand in der Milch 0,004%, in der Butter 0,15 bis 0,17%.

Neuere Untersuchungen liegen von Stocklasa (29), Bordas (30) und Raczkowsky, Koch, Nerking und Hänsel (32) vor. Die Resultate der beiden letzteren mögen, da sie neuesten Datums sind, hier kurz wiedergegeben werden.

	Lecithin
Kuhmilch	0,0629%
Eselsmilch	0,0165%
Schafsmilch	0,0833%
Stutenmilch	0,0109%
Ziegenmilch	0,0488%
Frauenmilch	0,0499%
Schweinemilch (49)	0,067 %

Auf diese Resultate und die zur Erlangung derselben angewandte Methode werde ich an späterer Stelle noch zurückkommen.

Ferner wurden gefunden:

in der weißen Hirnsubstanz	11,0%
„ „ grauen „	2,5%
„ „ Netzhaut	2,48%
„ „ Augenlinse	0,23%
„ Spermatozoen	1,50%
„ den roten Blutkörperchen	0,75%
„ der Galle	0,017 bis 53
„ Eiter	0,015 bis 56

[Otolski (14).]

In pflanzlichen Stoffen sind besonders von Schulze (33, 22) und seinen Schülern zahlreiche Lecithinbestimmungen ausgeführt worden. So wurden gefunden

in der blauen Lupine	1,59%
„ „ gelben „	1,55%
„ „ Wicke	1,22%
„ „ Gerste	0,74%
„ „ Sojabohne	1,64%

im Roggen	0,57 %
„ Weizen	0,65 %
„ Weizenkeimling	1,55 %
„ Lein	0,88 %
„ Leinkuchen	0,1 %

Auffallend ist der im Vergleich zum Lein geringe Gehalt des Leinkuchens an Lecithin; wahrscheinlich hat sich wohl beim Pressen ein Teil des Lecithins im Öl gelöst. Bemerkenswert ist ferner der hohe Lecithingehalt des Weizenkeimlings; in Übereinstimmung damit konstatierte Stocklasa (34), daß beim Maiskorn 74 % der vorhandenen Lecithinmenge dem Keimling und dem Schildchen und nur 26 % dem Endosperm angehörten.

Nach beiden Forschern steigt der Lecithingehalt mit Zunahme der Eiweißstoffe in der Pflanze; dementsprechend sind auch die Leguminosensamen reicher an Lecithin wie die Cerealien (s. Tabelle). Im allgemeinen fand Schulze

bei Leguminosen	0,74	bis	1,64 %
„ Cerealien	0,25	„	0,74 %
„ ölreichen Samen	0,25	„	0,88 %
„ Coniferen	0,11	„	0,47 %

Besonders hohen Lecithingehalt fand Stocklasa (34) in den Blütenteilen von Phanerogamen; in Pollenkörnern z. B. bis 6 %. Bei Lichtabschluß sinkt der Lecithingehalt; so fand Schulze (2) bei

Lupinus lut. entschälte Samen	2,1 %
„ „ in 14täg. etiolierten Keimpflanzen	0,56 %
in Wicken, etioliert	0,19 %
„ Wickensamen	0,74 %

Ferner fand Stocklasa (35, 34) in

Rübenblättern, 4 Uhr früh geschnitten	0,6	bis	0,68 %
„ 4 „ nachm. „	0,96	„	1,05 %
normalen Lupinenblättern	1,24 %		
etiolierten „	0,68 %.		

Dagegen vermehrt sich der Lecithingehalt bei normalem Wachstum, denn Stocklasa fand in Laubknospen der Roßkastanie 0,46 %, in den voll entwickelten Blättern 0,94 %. Dieser Umstand sowie die Tatsache, daß der Lecithingehalt in gelb gewordenen Blättern erheblich zurückgeht, haben Stocklasa

zu der Ansicht verleitet, daß das Lecithin nahe verwandt mit dem Chlorophyll sei — Chlorophyll = Lecithin, in dem die fetten Säuren durch Chlorophyllansäuren ersetzt sind. Diese Annahme ist jedoch falsch, da nach den Untersuchungen Willstätters (36) Chlorophyll keinen Phosphor enthält, sondern eine Magnesiumverbindung ist (Stocklasa [34]).

Zu ähnlichen Resultaten über das Verhalten des Lecithins in der Pflanze kamen Maxwell, Wallerstein, Frankfurt und Prianischnikoff (Czapek [1]). Außer den erwähnten wurde Lecithin noch in vielen anderen Pflanzen nachgewiesen, ferner auch in Pilzen und Bakterien.

Psalliota campestris	0,32 %
Boletus edulis	1,94 %

(Schulze [22]).

5. Die Prüfung der bisher üblichen Untersuchungsmethoden und Begründung der von mir angewandten Methode.

Bei allen vorher mitgeteilten Untersuchungen sind die Ansteller derart vorgegangen, daß das getrocknete, zerkleinerte Material die bestimmte Zeit hindurch mit Alkohol oder Äther extrahiert wurde. Von dieser Bestimmungsmethode glaubte ich bei meinen Untersuchungen abweichen zu müssen. Denn nach Soxhlet (Bericht über die Arbeiten der k. bayerischen Moorkulturanstalt im Jahre 1906, S. 186) findet beim Trocknen der Substanzen eine Zersetzung des Lecithins statt. „Auch bei raschem Trocknen in der Sonne zersetzt sich unter Abspaltung von Glycerinphosphorsäure der größere Teil des Lecithins; der Verlust war bei frischem Gras etwa 60 %. Wenn das Trocknen sehr langsam im Schatten, aber ebenfalls bei Sommerwärme, vor sich ging, war das Lecithin ganz verschwunden.“

Dieselbe Beobachtung konnte ich bei meinen Untersuchungen auch machen; die Belege dafür gestatte ich mir an späterer Stelle im Zusammenhang anzuführen. Daher war es für mich nötig, von der frischen Substanz auszugehen. Dementsprechend mußten natürlich größere Substanzmengen zur Untersuchung gelangen. Ich habe daher von voluminösen Futtermitteln (Heu und Stroh) 30 bis 50 g, von Samen 100 g, von Grünfutter 100 bis 200 g im Dreiliterkolben der Extraktion mit Alkohol

unterworfen. Äther schied, wie schon im ersten Teile dieser Arbeit darauf hingewiesen ist, als Extraktionsmittel von vorneherein aus (Schulze [22].)

Eigene Untersuchungen bestätigten das Resultat, das schon Schulze und andere gewonnen haben, denn es wurde gefunden:

In den Samen der blauen Lupine bei Extraktion mit Alkohol 0,0398 % Phosphor oder, auf Lecithin umgerechnet, 1,039 % Lecithin; bei Extraktion mit Äther 0,0059 % Phosphor, entsprechend 0,1555 % Lecithin. Um die großen Substanzmengen gehörig zu durchfeuchten, waren erhebliche Quantitäten Alkohols erforderlich; ich habe zu jeder Extraktion 800 g verwandt, der am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt wurde. Das Gefäß war tariert, es wurde nach dem Extrahieren wieder gewogen, um das Gewicht zu kontrollieren. Was die Extraktionsdauer anbelangt, so erklärt Schulze 2 Stunden für ausreichend; dies kann ich nach meinen Erfahrungen nicht bestätigen, wie folgende kleine Tabelle beweisen möge.

Gemahlener Lupinensamen	Phosphor %
2 Stunden extrahiert . . .	0,0421
8 „ „ . . .	0,0590

Bei späteren Versuchen:

Lupinensamen	Phosphor %
6 Stunden extrahiert . .	0,0344
10 „ „ . .	0,0422
13 „ „ . .	0,0461

Ähnliche Resultate ergaben sich bei der Untersuchung von Heu:

Grasheu	Phosphor %
2 Stunden extrahiert . .	0,0333
4 „ „ . .	0,0494

Im allgemeinen hielt ich eine 10stündige Extraktion für ausreichend, da bei längerer Extraktionszeit kaum noch nachweisbare, jedenfalls nicht mehr quantitativ bestimmbare Phosphormengen in Lösung gingen. Zu bemerken ist noch, daß die Samen fein gemahlen, die voluminösen Stoffe so fein wie möglich zerschnitten, zur Untersuchung kamen.

Daß tatsächlich durch die angewandte Extraktionsmethode das vorhandene Lecithin in Lösung übergeführt wird und auch ohne Zersetzung in Lösung bleibt, möge folgender Versuch beweisen:

Zu 100 g Lupinensamen wurde eine alkoholische Lösung von 0,5693 g reinem Eierlecithins (von Merk-Darmstadt bezogen), entsprechend 0,0218 g Phosphor, zugesetzt. In der 10 Stunden auf dem Wasserbade mit 800 g Alkohol am Rückflußkühler erhitzten Lösung wurde gefunden 0,0592 g Phosphor. Bei einem zweiten Versuch, bei dem 100 g Lupinen ohne Zusatz von Lecithinlösung ebenso behandelt wurden, wurde gefunden 0,0358 g Phosphor. Es enthielt also

	Phosphor
die Lösung ohne Lecithinzusatz . .	0,0358 g
„ „ mit „ . .	0,0592 g
Differenz	0,0234 g
zugesetzt war	0,0218 g

Nach diesem Befund war also nicht mehr zu befürchten, daß ein Teil des Lecithins sich der Einwirkung des Alkohols etwa dadurch entzog, daß es von Samenbestandteilen eingeschlossen wurde oder sich zersetzte und als anorganisches Phosphat in Alkohol unlöslich sich abschied. Als Beweis für die letztere Annahme mag noch angeführt werden, daß eine reine alkoholische Lecithinlösung, der ca. 0,5 g $CaCl_2$ zugesetzt war, auch bei mehrstündigem Kochen vollständig klar blieb, also keine Abspaltung der Phosphorsäure stattfand; die Phosphorsäure anorganischer Phosphate und ebenso Glycerinphosphorsäure wurde von $CaCl_2$ auch in alkoholischer Lösung sofort gefällt. Das Calciumphosphat erwies sich in 72% Alkohol (Gew. %) noch vollkommen unlöslich, andererseits wurde Kaliumphosphat selbst in 85% Alkohol noch z. T. gelöst. Da nun unter den Substanzen, die ich untersucht habe, Stoffe von 90% Wassergehalt keine Seltenheit waren, so wurde zu dem zu untersuchenden Material vor der Extraktion mit 800 g Alkohol stets 0,5 g $CaCl_2$ in Lösung zugesetzt, um Phosphorsäure anorganischer Salze, für deren Bindung der in den Pflanzen vorhandene Kalk etwa nicht ausreichte, in unlöslicher Form abzuscheiden. Für die sehr wasserreichen Substanzen ergab sich auch ein einmaliger Wechsel des Alkohols bei der Ex-

traktion als vorteilhaft; denn reines Lecithin löste sich in 90°/₀ Alkohol zu einer dauernd klar bleibenden Flüssigkeit. Die Lösung in 85°/₀ Alkohol zeigte erst nach längerem Stehen eine leichte Trübung, in 75°/₀ Alkohol jedoch löste sich das Lecithin nur in der Wärme und schied sich beim Erkalten in groben Flocken wieder aus. Aus diesem Grunde wurden wasserreiche Substanzen stets zweimal extrahiert. Die erste Extraktion diente im wesentlichen nur dazu, das Wasser zu entfernen. Bei Substanzen mit weniger Wassergehalt, also besonders Samen und dergleichen, genügte erfahrungsgemäß eine einmalige Extraktion. Nachstehende Tabelle möge hierfür als Beweis dienen.

Stoff	Wasser °/₀	Phosphor °/₀
Lupinen, frisch, bei einmaliger Extraktion . .	87,06	0,1195
„ „ „ zweimaliger „ . .	—	0,1387
Gras, frisch, einmal extrahiert	86,86	0,1531
„ „ zweimal „	—	0,2261
dagegen		
Lupinensamen, zweimal extrahiert	16,52	0,0530
„ einmal „	15,61	0,0552

Jedoch trat bei sämtlichen Extrakten bei der Abkühlung eine Trübung ein, die, wie nachgewiesen wurde, phosphorhaltig war. Diese Trübung löste sich beim Anwärmen auf 40 bis 50°. Aus diesem Grunde wurden alle Extrakte vor der Filtration und dem Abwägen zwecks Destillation usw. auf diese Temperatur gebracht. Für die Bestimmung der Phosphorsäure nun wurde ein Teil des Filtrates (ich habe meist 400 g für eine Bestimmung verwandt) abdestilliert, der Destillationsrückstand oxydiert und darin die Phosphorsäure in üblicher Weise bestimmt. Die Oxydation des Destillationsrückstandes versuchte ich anfangs durch rauchende Salpetersäure zu bewirken; bei diesem Verfahren blieb jedoch das Fett größtenteils unverändert, was für die späteren Operationen sehr störend war. Eine Zeitlang habe ich dann die Oxydation durch eine Schmelze mit Calciumnitrat im Eisentiegel vorgenommen. Die großen Calciummengen jedoch, die ich dadurch in meine Lösung bekam, machten eine doppelte Fällung mit Ammonmolybdat notwendig, wodurch das Verfahren zu zeitraubend wurde; außerdem ergaben sich Schwierigkeiten bei der Filtration der so außerordentlich salz-

reichen Lösungen. Schließlich bin ich dazu gekommen, die Oxydation, wie bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, im Schottschen Kolben mit konzentrierter Schwefelsäure vorzunehmen. Als katalytisch wirkende Substanz wurden statt des Quecksilbers in Rücksicht auf die Platingefäße Kupferdrehspäne verwandt. Der Destillationsrückstand wird in Natronlauge gelöst, in den Schottschen Kolben übergespült und mit 50 ccm konz. Schwefelsäure aufgeschlossen; die Aufschließung erfordert ca. 4 Stunden. Darauf wird die Lösung stark verdünnt, schwach ammoniakalisch, dann salpetersauer gemacht und schließlich mit Ammonmolybdat versetzt. Zum Beweise für die Brauchbarkeit dieser Methode mögen folgende Zahlen dienen:

Bei der direkten Bestimmung der Phosphorsäure in einer Phosphatlösung wurde gewogen 0,0836 g $Mg_2P_2O_7$, nach vorheriger Behandlung nach Kjeldahl 0,0840 g $Mg_2P_2O_7$. Ferner wurde gefunden in Lupinensamen bei Verwendung der Schmelze mit Calciumnitrat 0,0422 % P, dagegen 0,0367 % P bei Aufschließung mit konz. Schwefelsäure.

Kurz zusammengefaßt ergab sich also folgende Methode:

Das Material wird fein zerschnitten, resp. gemahlen, 2 Stunden mit 800 g Alkohol (94 %igem) am Rückflußkühler in einem vorher tarierten Kolben erwärmt, das Gewicht nochmals kontrolliert, dann filtriert und nochmals mit 800 g Alkohol 8 Stunden erwärmt. Beide Filtrate werden vereinigt, auf ca. 50° angewärmt und 400 g zur Destillation abgewogen. Im Destillationsrückstand erfolgt, wie oben angegeben, die Bestimmung der Phosphorsäure. Aus der gewogenen Pyrophosphatmenge wurde der Phosphorgehalt berechnet; eine weitere Umrechnung auf organische, in Alkohol lösliche Phosphorverbindungen unterblieb, weil wir ja, wie oben dargelegt ist, von der Konstitution dieser organischen Phosphorverbindungen noch nichts wissen. Nur an einigen wenigen Stellen habe ich durch Multiplikation der gefundenen Pyrophosphatmenge mit dem Faktor 7,2703 die Umrechnung auf Lecithin vorgenommen, um mit den Resultaten anderer Forscher vergleichbare Zahlen zu erhalten, da es früher üblich gewesen ist, den in organischen, in Alkohol löslichen Verbindungen enthaltenen Phosphor auf Lecithin umzurechnen.

6. Ergebnisse von Untersuchungen vegetabilischer Stoffe.

Wie schon bei Begründung der Methode hervorgehoben und wie auch schon Soxhlet erwähnte, findet beim Trocknen eine Zersetzung des Lecithins statt. Zum Beleg mögen folgende Zahlenangaben dienen. Für diese Zahlen ist zu bemerken, daß sie meine ersten Bestimmungen waren und nach den Angaben Schulzes das Material einer nur zweistündigen Extraktion mit Alkohol unterworfen wurde; daraus erklären sich die später mitgeteilten, z. T. nicht unerheblich höheren Zahlen für dieselben Substanzen. Das Trocknen geschah derart, daß die Substanzen 10 Stunden lang auf der Darre bei 70 bis 80° C gehalten werden; dann wurde das Material, so fein wie möglich zerkleinert, der Untersuchung unterworfen. Zum besseren Vergleich gebe ich den Wassergehalt mit an.

Material	H_2O %	Phosphor %
Kopfsalat, frisch	94,93	0,1487
Kopfsalat, getrocknet	10,37	0,0731
Algen (Spirogyra) frisch	89,74	0,0376
Algen (Spirogyra), getrocknet	9,596	0,0353
Rhabarberblätter, frisch	90,165	0,2934
Rhabarberblätter, getrocknet	7,218	0,0578
Gras, frisch	85,55	0,0780
Gras, getrocknet	4,898	0,0584
Heu, nicht getrocknet	14,74	0,0169
Heu, getrocknet	12,98	0,0091
Lupinensamen, nicht getrocknet	17,26	0,0496
Lupinensamen, getrocknet	8,03	0,0398
Haferkörner, nicht getrocknet	14,94	0,0203
Haferkörner, getrocknet	11,66	0,0189

Bezüglich der frischen Algen, deren relativ niedriger Wassergehalt vielleicht auffallen könnte, ist zu bemerken, daß nach Entfernung der anhaftenden Unreinigkeiten (Blätter u. dgl. aus dem Bache) die Hauptmenge des Wassers abgenutscht und dann erst das zerkleinerte Material der Extraktion unterworfen wurde. Die getrockneten Algen kamen fein im Mörser zerstoßen zur Untersuchung.

In Übereinstimmung mit Soxhlet konnte auch ich konstatieren, daß die Abnahme der in Alkohol löslichen Phosphatide um so beträchtlicher war, je länger der Prozeß des Trocknens andauerte. Auch hier gebe ich zur Erleichterung der Beurteilung der Beschaffenheit der Substanz den Wassergehalt mit an. Es gelangte einmal frisches Gras zur Untersuchung mit einem Wassergehalt von 85,55 %, dann wurde eine Probe desselben Grases 10 Stunden bei 70 bis 80° getrocknet; der Wassergehalt betrug jetzt 4,898 %. Eine zweite Probe wurde ca. 2 bis 4 Tage unter öfterem Wenden, auf Sieben ausgebreitet, lufttrocken gemacht, und zwar bei offenem Fenster und Sommerwärme, aber im Schatten. Der Wassergehalt des so erhaltenen Grasheues betrug noch 24,02 %. Die Untersuchung, auf Trockensubstanz bezogen, ergab folgendes:

	Phosphor %
Gras, frisch	0,0780
Gras, getrocknet	0,0584
Grasheu	0,0333

Im Anschluß hieran mag gleich noch eine Zahl Erwähnung finden. Soxhlet fand einen auffallend niedrigen Lecithingehalt in solchem Heu, das aus Gegenden stammte, in denen die Lecksucht herrschte, und glaubt in dem Fehlen der organisch gebundenen Phosphorsäure die Ursache für diese in einigen Gegenden Deutschlands grassierende Krankheit gefunden zu haben. Auch mir stand eine Probe derartigen Heues aus Turoscheln, Kreis Johannisburg, zur Verfügung, und hat die Untersuchung desselben die Ansicht Soxhlets nur bestätigen können, denn es wurde gefunden

	Phosphor %
in normalem Heu	0,0333
„ Lecksuchtheu	0,0169

Dieses Verhalten der in Alkohol löslichen Phosphatide, speziell des Lecithins, findet eine Bestätigung aus den Erfahrungen der landwirtschaftlichen Praxis. Dem Lecithin kommt, wie im ersten Teile darauf hingewiesen ist, im Tierkörper sicher eine sehr wichtige Funktion zu; denn gerade die edelsten Teile desselben, Gehirn und Rückenmark, sind besonders reich daran.

Eine außerordentliche Rolle spielen ferner die Phosphatide beim Wachstum des Tierkörpers, bei der Ausbildung des Knochengerüstes usw. Aus allen diesen Gründen erklärt sich die überaus günstige Wirkung des Weideganges bei der Aufzucht der jungen Tiere, während das Dürrheu mit seinem stark verminderten Gehalt an organischen Phosphorverbindungen nur einen sehr ungenügenden Ersatz für das Grünfutter bietet. Der Wert des Heues wird um so geringer, je länger dasselbe aufbewahrt wird, und auch keine Zugabe von Futterkalk vermag hier Ersatz zu bieten, denn das Tier verlangt gerade organisch gebundenen Phosphor in seiner Nahrung.

Nach den Untersuchungen Schulzes und Stocklasas (im ersten Teile angeführt) war es von Interesse, systematisch das Verhalten der in Alkohol löslichen Phosphatide während der Dauer einer Vegetationsperiode zu beobachten. Zu diesem Zwecke wurden im Frühjahr 1908 wenige Quadratmeter Gartenland zum Teil mit Lupinen, zum Teil mit Hafer bestellt. Von den normal sich entwickelnden Pflanzen wurden in Abständen von ca. 10 Tagen Proben auf ihren Gehalt an in Alkohol löslichen Phosphatiden untersucht. In nachstehender Tabelle finden sich die Resultate auf Trockensubstanz bezogen; das Datum der Probeentnahme ist beigeschrieben.

Hafer	Phosphor
18. VI.	0,1877 %
29. VI.	0,1767 %
8. VII.	0,2315 %
20. VII.	0,1413 %
29. VII.	0,2455 %
Lupinen	
23. VI.	0,1213 %
8. VII.	0,1420 %
16. VII.	0,1387 %
29. VII.	0,333 %

Zur Erläuterung diene noch folgendes: Der Hafer und ebenso die Lupinen befanden sich am 8. VII. in der Blüte. Am 29. VII. hatte der Hafer grüne Körner, die Lupinen kräftig entwickelte Schoten. Daraus erklärt sich auch das plötzliche Ansteigen der gefundenen Werte in den letzten Bestimmungen, denn gerade in den grünen Samen verschiedener Gewächse, und

speziell in den Lupinenschoten konnte ich, wie spätere Zahlen zeigen werden, einen relativ sehr hohen Gehalt an Phosphatiden feststellen. Im allgemeinen ist aus den Zahlen zu ersehen, daß der Gehalt an Phosphor in organischer Bindung bei Beginn der Vegetationsperiode beim Hafer etwas abnimmt, indem wahrscheinlich die in Alkohol löslichen Phosphatide wichtige Umlagerungen erfahren, die wohl mit den Vorbereitungen zum Schossen in Zusammenhang stehen dürften. Dann aber erfolgt zur Zeit der Blüte bei beiden Pflanzen eine rapide Zunahme, darauf beim Hafer ein beträchtliches, bei den Lupinen ein fast unmerkliches Absinken und schließlich wieder bei beiden enormes Ansteigen zur Zeit des Fruchtansatzes. Wie schon darauf hingedeutet, war in den Lupinenschoten der Phosphorgehalt besonders hoch, er betrug nämlich 0,4121 % Phosphor auf die Trockensubstanz bezogen, in den grünen Lupinensamen allein wurde gefunden 0,1560 % Phosphor in organischer Bindung; stellt man demgegenüber den Gehalt der reifen Lupinensamen mit 0,0422 % Phosphor, so ist der Unterschied auffallend. Jedenfalls ist das Lecithin, oder besser die in Alkohol löslichen Phosphatide bei der Samenreife wahrscheinlich in eine andere unlösliche organische Verbindung umgewandelt. Die Samen pflegen nur sehr geringe Mengen anorganischer Phosphate zu enthalten, und ist somit nicht anzunehmen, daß die Phosphorsäure des Lecithins zur Bildung anorganischer Phosphate Anlaß gibt.

In der üppig grünenden Pflanze und ebenso noch im unreifen Samenkorn treten die löslichen Phosphatide stark in den Vordergrund. Später, wenn der Herbst beginnt, die Samen gereift und die Blätter welk geworden sind, verschwindet der Phosphor aus den leicht löslichen Verbindungen, um an anderer Stelle und in anderer Gestalt wieder aufzutauchen.

Wie schon darauf hingedeutet, findet auch in den Blättern im Herbste nach Einstellung der Assimilationstätigkeit eine Verminderung der löslichen Phosphatide statt. So enthielten:

	Phosphor
grüne Tomatenblätter	0,1254 %
schon gelblich gefärbte Tomatenblätter	0,0349 %
Mais, obere Hälfte des Stengels mit grünen Blättern	0,0641 %

	Phosphor
Mais, obere Hälfte des Stengels mit bereits verfärbten Blättern . .	0,0266 %

Um übrigens beim Mais sogleich eine interessante Tatsache mitzuteilen, so enthielt die untere Hälfte des Stengels 0,1307 % Phosphor in organischer Bindung. Diese Untersuchung wurde im August ausgeführt und enthielt die obere Stengelhälfte zu dieser Zeit, wie schon oben angegeben, 0,0641 % Phosphor. Es scheint also doch so, daß das Lecithin entgegen den Befunden Stocklasas (1) wenigstens vorübergehend als Reservestoff abgelagert werden könne (40). Das Fortschreiten der Vegetationsperiode an sich, wenn die Pflanzenteile erst voll entwickelt sind, scheint wenig Einfluß auf die Phosphatide auszuüben. So wurde gefunden in grünen Birnenblättern:

	Phosphor
am 6. VIII.	0,0304 %
„ 1. X.	0,0348 %

Wie alle anderen Funktionen, so ist auch die Fähigkeit der Ausbildung löslicher Phosphatide abhängig von den Lebensbedingungen, unter denen sich die Pflanze befindet. Die normale, kräftig entwickelte Pflanze wird mehr Lecithin enthalten als die verkümmerte, die nur mühsam ihr Dasein fristet. Dementsprechend mußte sich auch die Wirkung verschiedener Düngung in Schwankungen des Phosphatidgehaltes zeigen.

Durch die Liebenswürdigkeit von Herrn Professor Dr. Albert standen mir Proben verschieden gedüngten Roggens vom Versuchsgute Waldgarten zur Verfügung, und zwar von einer ungedüngten, einer mit Chilisalpeter und einer mit Kalkstickstoff gedüngten Parzelle. Der Ertrag war von der Düngung derart beeinflußt worden, daß den höchsten Ertrag die mit Chilisalpeter gedüngte, den niedrigsten die ungedüngte Parzelle gegeben hatte. Wie verhielten sich die löslichen Phosphatide zu der Düngung? Zur Beantwortung dieser Frage erfolgte eine zweimalige Probeentnahme, das erstemal am 30. V. und das zweitemal am 14. VII., etwa 10 Tage vor der Reife des Roggens. Die Berechnung der gefundenen Mengen bezieht sich auf den Gehalt der Trockensubstanz an organisch gebundenem Phosphor per Meter Drillreihe. So wurde ermittelt am 30. V. (auf Trockensubstanz bezogen):

	Phosphor
ungedüngte Parzelle	0,0578
Kalkstickstoff-Parzelle . . .	0,0459
Chilisalpeter-Parzelle	0,0509
am 14. VII. ungedüngte Parzelle	0,0252
Kalkstickstoff-Parzelle	0,0306
Chilisalpeter-Parzelle	0,0322

Bei der ersten Probeentnahme tritt die Wirkung der Düngung noch nicht hervor, wenn auch hier schon der Chilisalpeter dem Kalkstickstoff sich deutlich überlegen zeigt. Bei der zweiten Probe jedoch stehen die Werte so zueinander, wie es auch der Wirkung der Düngung hinsichtlich der Quantität der erzielten Ernte entsprach. Die angewandte Berechnungsweise ist deshalb gewählt, weil dadurch auch der durch die Düngung bedingte mehr oder weniger üppige Stand der Pflanzen in der Drillreihe zum Ausdruck kommt.

Auch bei diesem Versuche finden wir wieder die absolute Verminderung der löslichen Phosphatide beim Herannahen der Reife.

Interessant und gleichzeitig eine Bestätigung für die oben aufgestellte Behauptung, daß der Gehalt an Phosphatiden mit der Entwicklung der ganzen Pflanze Hand in Hand geht, ist folgende Tatsache. In schon gelblich gefärbten Erbsenblättern wurde ein Phosphorgehalt von 0,05623 % gefunden. In jungen blühenden Erbsen erwartete ich, meinen früher erhaltenen Resultaten entsprechend, erheblich mehr zu finden; aber gerade das Gegenteil war das Fall. Es wurde nämlich darin nur 0,03144 % Phosphor gefunden. Zur Erklärung diene folgendes: Die Erbsen waren erst spät im Herbste gesäet und sehr schlecht aufgegangen; von dem ganzen Stück, ca. 5 bis 6 qm, konnte ich kaum die für eine Bestimmung ausreichende Menge zusammen bekommen, und auch dies waren verkrüppelte, elende Pflänzchen. Hierdurch ist, meines Erachtens, die auffallende Erscheinung zur Genüge erklärt.

Wie schon im ersten Teile darauf hingewiesen, hat Stocklasa (34) einen besonders hohen Lecithingehalt in allen Teilen der Blüte der Phanerogamen, vor allem aber in den Organen der Fortpflanzung, dem Pollen gefunden. Auch ich habe über diesen Gegenstand Untersuchungen angestellt, nachstehend die Resultate:

	Phosphor %
Gurkenblüten, unfruchtbare	0,0796
Levkoienblüten, gefüllt	0,0782
Levkoienblüten, ungefüllt	0,0292
Rotkleeköpfe	0,0421
Weißklee	0,0396
Artischocken	0,0522

An und für sich betrachtet, sind ja die Resultate ziemlich hoch, aber im Vergleich zu den bei grünen Substanzen, wie frischem Hafer und Lupinen erhaltenen Werten, doch recht niedrig. Auffällig ist der Unterschied zwischen den gefüllten und nicht gefüllten Levkoienblüten.

Besonderes Interesse beanspruchen endlich noch einige Resultate, die unmittelbar in das Gebiet der menschlichen Ernährung hinübergreifen. Die frischen Gemüse, die im Frühjahr und Sommer wohl auf keinem Tische fehlen und deren Bekömmlichkeit allgemein anerkannt ist, haben sich als besonders reich an leicht löslichen Phosphatiden herausgestellt. In folgender Tabelle sind die Resultate der diesbezüglichen Untersuchungen zusammengestellt, bezogen auf Trockensubstanz.

	Phosphor %
Salat	0,3671
Rhabarber	0,3357
Schneidebohnen	0,2503
grüne Erbsen	0,1472
Tomaten, grüne Früchte . . .	0,2474

Man wird wohl kaum fehl gehen, wenn man die vorzügliche physiologische Wirkung dieser Stoffe zum großen Teil auf Konto der in Alkohol löslichen Phosphatide setzt.

Noch einige wenige Zahlen seien mitgeteilt, die an und für sich des Materials wegen von Interesse sind. So wurde im frischen Sphagnummoos gefunden 0,0375 % Phosphor, in Fichtennadeln von frischen Trieben 0,0149 % Phosphor in organischer Bindung.

7. Zusammenfassung der bei der Untersuchung von Pflanzenstoffen erhaltenen Ergebnisse.

Bei kurzer Zusammenfassung der erhaltenen Resultate ergibt sich folgendes Bild:

1. Der Gehalt an in Alkohol löslichen Phosphatiden ist besonders hoch in den frischen, grünen Organen der Pflanze, namentlich auch in frischen Gemüsen.

2. Der Gehalt der Blüten tritt demgegenüber ziemlich zurück.

3. Ein starkes Ansteigen des Gehaltes an Phosphatiden findet statt zur Zeit der Blüte und des Fruchtansatzes.

4. Beim Trocknen zersetzen sich die in Alkohol löslichen Phosphatide zum Teil.

5. Ebenso findet eine Zersetzung statt am Ende der Vegetationsperiode der Pflanzen.

Auf die Schlüsse, die sich aus dem in Punkt 1, 2 und 4 angedeuteten Verhalten der Phosphatide, besonders auch für die Praxis, ziehen lassen, ist schon im Verlaufe der Abhandlung hingedeutet worden. Es erübrigen sich noch einige Bemerkungen über die Punkte 3 und 5. Gerade dann, wenn in der Pflanze die lebhaftesten Wachstumsvorgänge sich zeigen, wenn sie sich auf dem Höhepunkt ihrer Entwicklung befindet, zur Zeit der Blüte und des Fruchtansatzes, schwillt der Gehalt an Phosphatiden mächtig an. Eine Erklärung für dieses Verhalten bieten vielleicht die Untersuchungen Overtons (41, 42) über die Aufnahme von Anilinfarben durch die lebende Zelle und über deren allgemeine osmotischen Eigenschaften. Genannter Forscher glaubt auf Grund seiner Untersuchungen den Lecithinen einen bedeutenden Anteil an der Zusammensetzung und den osmotischen Eigenschaften der Plasmahaut zuschreiben zu müssen, speziell setzt er, gestützt auf seine Versuche mit in wässeriger Lösung suspendierten Anilinfarbstoffen die eigentümliche Auswahl, welche die lebende Zelle unter den diosmierenden Substanzen trifft, auf Konto des Lecithins. Man wird also wohl kaum fehlgehen, wenn man den Lecithinen eine beschleunigende Wirkung bei der Diosmose der Stoffe, speziell vielleicht der Eiweißstoffe, durch die Plasmahaut zuschreibt. Zur Zeit der lebhaftesten Wachstumsvorgänge in der Pflanze, wenn besonders viel Bildungsstoff verbraucht wird, steigt auch

die Menge der Phosphatide; später im Herbst, wenn die Wachstumsperiode sich ihrem Ende nähert, gehen auch sie wieder in anders geartete schwerlösliche, vielleicht sogar anorganische Phosphorverbindungen über. Es ist wohl denkbar, daß die Phosphatide in diesem Sinne, gewissermaßen als aktivierendes Agens auch bei der Ausbildung des Chlorophylls beteiligt sind, wenn sie auch entgegen der Annahme Stocklasas, auf Grund der neuen Untersuchungen Willstätters mit dem Chlorophyll an sich nichts zu tun haben.

8. Untersuchung tierischer Stoffe.

Bei der Untersuchung tierischer Stoffe bediente ich mich genau derselben Methode wie bei der pflanzlicher Substanzen, so daß sich also ein weiteres Eingehen darauf erübrigt. Zunächst habe ich mich mit der Untersuchung der Milch beschäftigt, vornehmlich in der Absicht, etwas zur Klärung des Verhältnisses des Lecithins zum Milchfett beizutragen. Die Angaben über den Lecithingehalt beziehen sich auf die Milchtrockensubstanz, den Fettgehalt, wie üblich, auf die frische Milch. Die Beziehung der ersteren Zahlen auf die Trockensubstanz wurde deshalb gewählt, um mit den übrigen Untersuchungen unmittelbar vergleichbare Zahlen zu erhalten.

	Fett %	Phosphor %
Kuhmilch . . .	3,4	0,05223
„ . . .	3,2	0,05534
„ zentrifug.	0,2	0,0504
Ziegenmilch . . .	4	0,05019
Eselsmilch . . .	?	0,04998
Schafsmilch . . .	7,5	0,05857

Bei der Eselsmilch war der Fettgehalt nicht bestimmbar, betrug also jedenfalls unter 0,1%. Aus diesen Zahlen läßt sich kaum eine Beziehung zwischen Lecithin und Fettgehalt ableiten. Die so außerordentlich fettarme Eselsmilch hat fast denselben Gehalt an Phosphor in organischer Bindung wie die bedeutend fettreichere Ziegenmilch. Nur die Schafsmilch weist den höchsten Fett- und auch den höchsten Phosphorgehalt auf. Trotzdem möchte ich beide nicht voneinander abhängig machen, sondern den höheren Phosphorgehalt vielmehr mit dem höheren

Trockensubstanz- und somit Proteingehalt der Schafsmilch in Verbindung bringen. Denn während der Wassergehalt der Kuhmilch 88,84 %, der Ziegenmilch 87,78 %, der Eselsmilch gar 94,97 % beträgt, hat die Schafsmilch einen Wassergehalt von nur 81,12 %. Dieser Annahme entsprechend, daß also Fett- und Phosphatidgehalt durchaus unabhängig voneinander sind, hat auch die Magermilch mit nur 0,2 % Fett fast denselben Phosphorgehalt, nämlich 0,0504 %, wie die ihr entsprechende Vollmilch mit 3,2 % Fett und 0,05534 % Phosphor. Letzterer Befund steht im Gegensatz zu den Resultaten von Bordas und Raczkowsky (30), welche fanden, daß bei der Entrahmung 69 % des Lecithins in den Rahm übergingen. Doch dürfte die Bestimmungsmethode dieser Forscher nicht ganz einwandfrei sein. Andrerseits finden meine Resultate eine Stütze in den Untersuchungen von Koch (31, 11), der geradezu zu dem Schlusse kommt: „Das Lecithin verhält sich in der Milch garnicht als Fett und geht deshalb auch nicht in besonderer Menge in den Rahm über.“ Im Gegensatz zum Fett benetzt sich Lecithin beispielsweise mit Wasser. Koch trennt bei der Bestimmung des Lecithins in der Milch von diesem als zweiten phosphorhaltigen Bestandteil der Milch, das Kephalin, ab, eine Trennung, die sonst von keinem Forscher durchgeführt ist; daher hat die Bezeichnung „Lecithingehalt der Milch“ auch eigentlich gar keine Berechtigung, von den Kochschen Resultaten abgesehen. Ein Umstand bedarf indessen noch der Aufklärung: meine über den Phosphorgehalt der Milch erhaltenen Resultate sind nicht unerheblich höher als die bereits im ersten Teil erwähnten, welche von Nerking und Haensel (32) erhalten wurden. Der Grund dürfte den verschiedenen Untersuchungsmethoden zuzuschreiben sein. Die beiden erwähnten Forscher verfuhren derart, daß ein bestimmtes Quantum Milch mit Alkohol gefällt und der Rückstand, sowie das eingedunstete Filtrat mit Chloroform extrahiert wurden; die Extraktion des Rückstandes geschah im Soxhlet-Apparat. Bedenklich ist dabei, daß die Eiweißstoffe in der Hülse des Soxhlet-Apparates, also als zusammengeballte Masse, der Extraktion unterworfen wurden; doch kann vielleicht die lange Extraktionsdauer (30 Stunden) dies Bedenken beseitigen, wenn auch in der Arbeit nicht erwähnt ist, ob das Material hinsichtlich seiner Erschöpfung an in Chloro-

form löslichen Phosphorverbindungen einer Prüfung unterzogen wurde. Aber selbst wenn dies der Fall war, so handelte es sich um in Chloroform lösliche Phosphatide, während mein Extraktionsmittel Alkohol war. Stocklasa (29), der ebenfalls Alkohol als Extraktionsmittel benutzte, kommt meinen Resultaten ziemlich nahe; er findet 0,090 bis 0,113% Lecithin in der Kuhmilch, auf frische Substanz bezogen, also meinen Ergebnissen ziemlich entsprechend. Denn wenn ich den von mir gefundenen Phosphorgehalt von 0,055 34% auf Lecithin umrechne, so ergeben sich 1,444% Lecithin in der Trockensubstanz. Die noch bleibende Differenz findet wohl darin ihre Erklärung, daß Stocklasa erst die auf Sand getrocknete Milch extrahiert, was nach meinen früheren Angaben unzulässig ist.

Bekanntlich erleidet die Milch beim Erhitzen tiefgreifende Veränderungen — näher darauf einzugehen, erübrigt sich wohl an dieser Stelle —, so war es auch zu erwarten, daß ebenfalls der Phosphorgehalt von diesen Veränderungen würde betroffen werden; und in der Tat, während die frische Milch 0,05534% Phosphor in organischer Bindung enthielt, fanden sich in der nur ganz kurze Zeit auf 100° C erhitzten Milch 0,0448% Phosphor. Bei der nur bis auf 70° C erwärmten Milch dagegen war noch keine Abnahme im Phosphatidgehalt bemerkbar. Daraus folgt für die Praxis, daß zwar das Anwärmen der Milch vor dem Zentrifugieren, vielleicht auch noch das Pasteurisieren, ohne nachteilige Wirkung auf den Phosphatidgehalt der Milch sind, daß das Sterilisieren aber jedenfalls eine teilweise Zerstörung der organischen Phosphorverbindungen und damit ihrer spezifisch günstigen Wirkungen auf das junge Tier hervorruft. Unterstützt wird dieser Befund durch die Tatsache, daß mit sterilisierter Milch in der Jungviehaufzucht bei weitem nicht die Erfolge erzielt werden können wie mit frischer. Selbstverständlich hat das Sterilisieren andererseits sehr viele Vorteile auf seiner Seite, doch ist hier nicht der Ort, näher darauf einzugehen.

Endlich sei noch eine Beziehung angeführt, die in gewissem Sinne an die im ersten Teil erwähnten Untersuchungen Glikins (27) erinnert. Dieser fand besonders hohen Lecithingehalt bei solchen Tieren, die besonders hilflos zur Welt kamen, in erster Linie bei den Nesthockern unter den Vögeln. Bezug-

nehmend auf meine bei der Milchuntersuchung gewonnenen Resultate, glaube ich hinzufügen zu können: der Lecithin- oder überhaupt Phosphatidgehalt der Milch, d. h. der natürlichen Ernährungsflüssigkeit des Säuglings ist um so höher, je schneller das Junge sich entwickelt, je eher es die Mutter verläßt, um mit eigener Kraft den Kampf ums Dasein aufzunehmen. Enthält nach Glikin das früh selbständig werdende Geschöpf wenig Phosphatide, so weist doch seine Nahrung einen um so höheren Gehalt daran auf.

So beträgt der Phosphorgehalt der Kuhmilch 0,055 %, der Ziegenmilch 0,050 %, der Eselsmilch 0,050 %, der Schafsmilch endlich 0,058 %; hier also kein wesentlicher Unterschied, wenngleich man zugeben wird, daß das Lamm nach der Geburt sich schneller entwickelt, als z. B. der junge Esel. Sehen wir dagegen die Frauenmilch (welche durch den Direktor der hiesigen Universitäts-Frauen-Klinik gütigst zur Verfügung gestellt war) mit nur 0,027 % Phosphor in organischer Bindung, so ist der Unterschied geradezu auffallend. Der Mensch kommt wohl am hilflosesten von allen Geschöpfen auf die Welt, er wächst, abgesehen vom Elefanten, am langsamsten, seine erste Nahrung ist arm an Phosphatiden.

Angeführt sei noch ein Resultat, den Phosphatidgehalt des Käses betreffend. So enthielt Tilsiter Käse 23,33 % Fett und 0,02096 % Phosphor. Jedenfalls erleidet der organisch gebundene Phosphor während der Reifung des Käses usw. tiefgreifende Umwandlungen.

Bei der Untersuchung anderer Materialien erhielt ich Resultate, die den Glikinschen (27) in gewissem Sinne besser entsprechen. So enthielt Forellenrogen 0,4153 % Phosphor, Hechtrogen 0,4434 % Phosphor (der Fischrogen wurde mit Sand verrieben der Extraktion unterworfen); oder wenn ich, um mit den Glikinschen vergleichbare Resultate zu erhalten, den gefundenen Phosphorgehalt auf Lecithin umrechne, 10,83 % bzw. 11,67 % Lecithin. Diese Resultate sind erheblich niedriger als die, welche Glikin für den Dotter des Taubeneies, resp. Hühnereies erhielt, nämlich 28,54 % bzw. 15,41 % Lecithin. Sämtliche Substanzen sind einander morphologisch gleichwertig, alle stellen eine Zelle dar; aber der junge Vogel kommt hilfloser auf die Welt als der junge Fisch, daraus er-

klärt sich, nach Glikin, die Verschiedenheit im Phosphatidgehalt.

Endlich bezogen sich meine Untersuchungen auf eine vergleichende Gegenüberstellung von Rind- und Pferdefleisch. Und siehe da, hier, wie in vielem anderen, zeigte sich das Pferdefleisch dem Rindfleisch überlegen; denn es enthielt Pferdefleisch 0,1700 °/₀ Phosphor, Rindfleisch 0,1383 °/₀ Phosphor. Auch dieses Material wurde fein gemahlen und mit Sand verrieben der Untersuchung unterworfen.

9. Die Darstellung des Lecithins.

Als Ausgangsmaterial für die Darstellung des Lecithins wählte ich wegen seines relativ hohen Gehaltes und seiner Billigkeit das Pferdefleisch. In der Methode bin ich im wesentlichen Otolski (14) gefolgt, wie dieser sie zur Darstellung des Lecithins aus Knochenmark anwendet. Ich verfuhr folgendermaßen: $^1/_2$ kg frisches, fein gemahlenes Pferdefleisch wurde zweimal je 4 Stunden mit ca. 800 g Alkohol am Rückflußkühler extrahiert; darauf wurde die Substanz mit Sand verrieben und nochmals 4 Stunden der Extraktion mit Alkohol unterworfen. Sämtliche Filtrate wurden vereinigt, der Alkohol abdestilliert und der Rückstand in der Kälte mit Äther ausgeschüttelt, bis nichts mehr in Lösung ging. Die ätherische Lösung wurde eingedunstet, der Rückstand in wenig Äther gelöst und ca. mit dem vierfachen Volumen Aceton versetzt. Es fiel ein voluminöser, bräunlicher Niederschlag aus, der nach 24stündigem Stehen abfiltriert, in Äther gelöst und nochmals mit Aceton gefällt wurde. Das Endresultat war eine hellbraune, weiche Masse, die sich an der Luft rasch bräunte und somit äußerlich die Eigenschaften des Lecithins zeigte. Die Ausbeute entsprach etwa der nach dem Phosphorgehalt zu erwartenden Menge. Die Analyse der Substanz zeigte einen Phosphorgehalt von 3,513 °/₀ und einen Stickstoffgehalt von 2,784 °/₀. Der theoretisch nach der Formel berechnete Phosphorgehalt und Stickstoffgehalt des Distearyllecithins würde 3,84 °/₀ Phosphor bzw. 1,7 °/₀ N ergeben. Wahrscheinlich war das von mir hergestellte Präparat also noch durch irgendwelche stickstoffhaltige Substanzen verunreinigt.

Um vielleicht zu einem Präparate von größerer Reinheit zu gelangen, versuchte ich die Darstellung des Platindoppelsalzes des Lecithins. Diesem kommt nach **Strecker** (6) folgende Formel zu: $(C_{42}H_{83}PNO_8Cl)_2PtCl_4$, mit einem Phosphorgehalt von 3,216%, Stickstoff 1,453% und Platin 10,1%. Es soll dieses Salz im Gegensatz zum sonstigen Verhalten der Platinsalmiakverbindungen in Äther löslich, in Alkohol aber unlöslich sein (37). Bei der Darstellung verfuhr ich zunächst in derselben Weise, wie oben angegeben, dann wurde der mit Aceton erhaltene Niederschlag in Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung mit einer alkoholischen Platinchloridlösung versetzt; es entstand sofort ein gelblich gefärbter, voluminöser Niederschlag, der abfiltriert und mit Äther behandelt wurde. Ein Teil des Niederschlages, der im folgenden mit I bezeichnet werden möge, war in Äther unlöslich, oder doch wenigstens sehr schwer löslich. Die ätherische Lösung wurde mit dem doppelten Volum Alkohol versetzt; es entstand sofort ein hellgelber Niederschlag, im Folgenden mit II bezeichnet. Zur näheren Untersuchung gelangte außer I und II noch das eingedunstete Filtrat von II, welches ich mit III bezeichne. In allen 3 Substanzen wurde das Verhältnis von Phosphor : Stickstoff : Platin bestimmt. Es ergab sich folgendes Resultat:

	P :	N :	Pt
I.	1 :	0,3736 :	3,016
II.	1 :	1,005 :	5,893
III.	1 :	0,3939 :	2,353

Aus der theoretischen Formel ergibt sich folgendes Verhältnis: P : N : Pt = 1 : 0,4519 : 3,141.

Diesem Verhältnis kommt die mit I bezeichnete Substanz jedenfalls am nächsten, während die mit II bezeichnete Substanz, also der mit Alkohol aus ätherischer Lösung erhaltene Niederschlag, der, entsprechend der Darstellungsweise, als eigentliches Lecithin anzusehen sein würde, ganz erheblich davon abweicht.

Aus diesen Resultaten geht zweifellos hervor, daß wir es bei dem durch Extraktion des Pferdefleisches erhaltenen Produkte jedenfalls nicht mit einer einheitlichen Substanz zu tun haben. Ihr **Platinsalz** scheidet sich mindestens in drei qualitativ und quantitativ verschiedene Teile.

I. In Alkohol und Äther unlöslich (sehr wenig).
II. In Alkohol unlöslich (Hauptmasse).
III. In Alkohol und Äther löslich.

Ähnlich haben auch Stern und Thierfelder (38) aus Eigelb ein in Alkohol schwer lösliches, ein in Äther schwer lösliches und ein in Alkohol und Äther lösliches Phosphatid isoliert.

Erlandsen (39) stellte aus Ochsenfleisch verschiedene Phosphatide dar, die einander wohl ähnlich waren, mit Cadmium- und Platinchlorid Niederschläge gaben, aber alle durch verschiedenen Phosphor- und Stickstoffgehalt charakterisiert waren. Eines derselben, welches er Cuorin nennt, zeichnete sich dadurch aus, daß es sich noch bedeutend schneller, als das eigentliche Lecithin, an der Luft oxydierte. Direkte Parallelen lassen sich aus den Befunden Erlandsens zu meinen Präparaten nicht ziehen, da die Darstellungsweisen und ja auch das Ausgangsmaterial voneinander abweichen. Im übrigen ist auch die Formel des Platinsalzes zu unsicher, als daß sich aus der Vergleichung der gefundenen Substanzen mit der theoretischen Formel bestimmte Schlüsse ziehen ließen.

Eine strenge Trennung dieser Substanzen auf Grund charakteristischer, chemischer Reaktionen ist bisher noch nicht gelungen. Auch über das Cadmiumsalz ist nach Schulze (46) eine Reindarstellung von Lecithin nicht möglich; sämtliche erhaltenen Präparate schlossen meist wechselnde Mengen von Kohlenhydrat ein.

10. Zusammenfassung der Resultate und Schluß.

Eine kurze Zusammenfassung sämtlicher Resultate ergibt folgendes Bild: Die Phosphatide sind untrennbar mit dem Stoffwechsel und überhaupt mit Lebensvorgängen in den Pflanzen verbunden. Der Gehalt an Phosphatiden steigt bis zur Zeit des Fruchtansatzes, dem Höhepunkt der Entwickelung, nimmt ab zur Zeit der Reife. Ein analoges Verhalten darf man wohl auch für tierische Stoffe annehmen. Wenn auch lückenlose Versuchsreihen hierfür bisher noch fehlen, so hat doch schon Glikin (26) Abnahme des Lecithingehaltes mit zunehmendem Alter konstatiert. Mit Fett, zu dem es so gern in Beziehung

gebracht wird, hat Lecithin oder die Phosphatide überhaupt wahrscheinlich nichts zu tun.

Wenn man nun fragt: Welche Rolle spielen wohl die Phosphatide im Leben der Zelle ?, so fällt eine Eigenschaft der Phosphatide unwillkürlich auf, das ist ihre leichte Oxydierbarkeit. Sämtliche in frischem Zustande hellgelb gefärbte Phosphatidpräparate werden nach kurzem Verweilen an der Luft dunkelbraun, eine Erscheinung, die nach Erlandsen (39) auf der Aufnahme von Sauerstoff beruht. Vielleicht also wirken die Phosphatide in der Zelle als Sauerstoffüberträger, eine Vermutung, die schon Koch (11) ausgesprochen hat. Das Leben ist untrennbar an Oxydationserscheinungen gebunden und in allem, was lebt, Tier oder Pflanze, hat man Phosphatide gefunden, wo man auch danach suchte. Außerdem dürfte wohl die kolloidale Natur der Phosphatide für die Zelle von Bedeutung sein, denn das Substrat des Lebens selbst, wenn man so sagen darf, das bisher noch so rätselvolle Protoplasma, ist ein Kolloid. Ob alle Phosphatide in gleicher Weise derart am Stoffwechsel der Zelle beteiligt sind, das zu entscheiden, muß der Zukunft überlassen bleiben. Einstweilen fehlen uns noch geeignete Methoden, welche eine scharfe Trennung der Phosphatide ermöglichen. Im tierischen Muskel spielen die Phosphatide vielleicht eine ähnliche Rolle wie die Phosphorfleischsäure; diese steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Muskelbewegung, und zwar derart, daß im arbeitenden Muskel der Gehalt an Phosphorfleischsäure abnimmt. Andrerseits ist zwischen den Phosphatiden und der Phosphorfleischsäure ein fundamentaler Unterschied darin gegeben, daß erstere in Alkohol löslich, in Wasser aber unlöslich sind, letztere sich gerade umgekehrt verhält (46, 47, 48).

Auf die interessanten Untersuchungen von Kyes über die aktivierende Wirkung, welche die Phosphatide auf verschiedene Gifte ausüben, daß z. B. Kobragift erst hämolytisch wirksam wird, wenn es mit minimalen Mengen von Phosphatid zusammenkommt, sei hier nur hingewiesen (43). Neuere Untersuchungen von Bang (44) lassen die Resultate von Kyes allerdings wieder zweifelhaft erscheinen.

Literatur.

1. Czapek, Biochemie der Pflanzen 1, 152.
2. Schulze, Chem.-Zeitg. 1897, Nr. 38, 375.
3. Schulze u. Likiernik, Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 405.
4. Laves, Chem.-Zeitg. 1903, Nr. 78, 955.
5. Ulzer-Klimont, Chemie der Fette, S. 195.
6. Strecker, Liebigs Annalen 148, 77, 1868.
7. Gilson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 12, 585.
8. Mayer, P., diese Zeitschr. 1, 41, 1906.
9. Thudichum, Die chem. Konstit. des Gehirns des Menschen u. der Tiere. Tübingen 1901.
10. Porges u. Neubauer, diese Zeitschr. 7, 152, 1908.
11. Koch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 181.
12. Beilstein, 1, 343.
13. Ehrenfeld, Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 90.
14. Otolski, diese Zeitschr. 4, 1907.
15. Zuelzer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 255.
16. Schulze u. Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 101.
17. Schulze, Chem.-Zeitg. 1908, 981.
18. Bergell, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1900, 2584.
19. Schulze, Chem.-Zeitg. 1904, 751.
20. Winterstein u. Hiestand, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 496.
21. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 230.
22. Schulze, Landwirtschaftl. Versuchsstat. 43, 307.
23. Bitto, Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 488.
24. Manasse, diese Zeitschr. 1, 246, 1906.
25. Nerking, diese Zeitschr. 10, 193, 1908.
26. Glikin, diese Zeitschr. 4, 235.
27. Glikin, diese Zeitschr. 7, 286, 1908.
28. Schmidt-Mühlheim, Jahresber. über Fortschritte in d. Tierchemie 1883, 166.
29. Stocklasa, Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 343.
30. Bordas u. Raczkowsky, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 1903, 593 u. 594.
31. Koch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 47, 327.
32. Nerking u. Haensel, diese Zeitschr. 13, 348.
33. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 365.
34. Stocklasa, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1896, 2761.
35. Stocklasa, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 398.
36. Willstädter, Liebigs Annalen 1907.
37. Oppenheimer, Handb. d. Biochemie, S. 137.
38. Stern u. Thierfelder, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 370.
39. Erlandsen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 71.
40. Schulze u. Castoro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 483.
41. Overton, Vierteljahrschr. d. Naturf.-Gesellsch. in Zürich 44, 88.

42. Overton, Zeitschr. f. physikal. Chem. 22, 189.
43. Kyes, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 273.
44. Bang, diese Zeitschr. 11, 521.
45. Schulze, Zeitschr. f. physiol. Chem. 55, 338.
46. Siegfried, Zeitschr. f. physiol. Chem. 21, 360.
47. Krüger, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 95.
48. Macleod, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 535.
49. Ostertag, Landw. Jahrbücher 37, 213, 1908.
50. Wintgen u. Keller, Arch. d. Pharmazie, S. 244.
51. Hiestand, Inauguraldissertation. Zürich 1906.

Über die Adsorption durch Tone.

Von

P. Rohland.

(Aus dem Institut für Elektrochemie und techn. Chemie der Techn. Hochschule zu Stuttgart.)

(Eingegangen am 15. März 1909.)

L. Michaelis und P. Rona berichten in einer in dieser Zeitschrift[1]) erschienenen Abhandlung, „daß Albumosen in vorzüglicher Weise von Kaolinen, die weder Essigsäure noch Aceton, noch einen anderen, die Oberflächenspannung erniedrigenden Stoff in irgendwie beträchtlichen Mengen enthalten, adsorbiert werden, und sind der Ansicht, daß die Adsorption der Albumosen durch Kaolin ein von der mechanischen Adsorption wesensverschiedener Prozeß ist".

Hierzu ist zunächst zu sagen, daß Kaoline sich von allen Tonarten am wenigsten zu solchen Versuchen eignen; sie sind sehr gering plastisch, können sogar unplastisch sein; denn aus ihnen sind die kolloidalen Hydroxyde des Siliciums, Aluminiums, Eisens, welche die Adsorption der Albumosen hervorrufen, bei der Kaolinisierung schon durch das Wasser entfernt und fortgeführt worden.

Kaolin, in seiner reinsten Form der Zusammensetzung, Al_2O_3, $2SiO_2$, $2H_2O$ entsprechend, ist der Hydrolyse, durch welche die genannten Hydroxyde gebildet werden, wegen seiner komplexen Konstitution, fast gar nicht unterworfen.

Zu solchen Versuchen eignen sich besser dunkelgefärbte, stark plastische Tone, die diese Kolloidstoffe in größerer Menge in Berührung mit Wasser bilden, z. B. solche aus Striegau in Schlesien, die der Analyse nach die Zusammenstellung haben:

[1]) Diese Zeitschr. 15, 196, 1908.

SiO_2	52,53 %
Al_2O_3	29,01 %
Fe_2O_3	3,43 %
CaO	1,00 %
MgO	0,02 %
K_2O	1,00 %
Wasser und Glühverlust	13,40 %
	100,40 %

oder Colditz in Sachsen:

SiO_2	46,61 %
Al_2O_3	36,47 %
Fe_2O_3	2,81 %
CaO	0,14 %
K_2O	1,44 %
Glühverlust	12,80 %
	100,27 %

oder Weigersdorf in Sachsen:

SiO_2	38,57 %
Al_2O_3	23,55 %
Fe_2O_3	0,85 %
CaO	0,31 %
MgO	0,22 %
K_2O	0,70 %
K_2O	24,00 %
Glühverlust	11,80 %
	100,00 %

Diese Tone sind ferner noch durch sehr hohen Glühverlust charakterisiert; sie enthalten größere Mengen organischer Substanzen; und auch diese sind wahrscheinlich kolloider Natur.

Diese Tone[1])[2]) adsorbieren aber nicht nur Albumosen, sondern Eiweiß der verschiedensten Herkunft, Fette, Öle, Stärke, Dextrin, Isomaltose, Gummi, konzentrierte Seifenlösung von anorganischen Stoffen, Eisenhydroxyd, Aluminiumhydroxyd u. a.

Alle diese adsorbierten Substanzen haben selbst kolloidalen Charakter; und es kann als Gesetzmäßigkeit bezeichnet werden,

[1]) P. Rohland, Über die Adsorptionsfähigkeit der Hydroxyde des Siliciums, Aluminiums, Eisens II. Zeitschr. f. anorgan. Chem. 60, 366, 1908.

[2]) Tonindustrie-Zeitg. 1907, 31, 972 u. f.

daß koagulierte Kolloide von einer anderen Kolloidlösung nichts aufzunehmen vermögen, entweder ganz ihre Diffusion verhindern, oder sie nur ganz langsam diffundieren lassen, während sie dem krystalloiden Wasser und anderen krystalloiden Stoffen den Durchgang gestatten.

Aber auf diese Kolloidstoffe ist das Adsorptionsvermögen dieser Tone nicht beschränkt; sie vermögen ferner krystalloide Substanzen zu adsorbieren,[1]) aber nur ganz bestimmte, nämlich Farbstoffe vom komplizierten Aufbau; während sie einfach zusammengesetzte Farbstoffe, wie Kupfersulfat und Kalidichromat, diffundieren lassen, adsorbieren sie schon lösliches Berliner- und Turnbullsblau, Teerfarbstoffe wie Anilinblau, Anilinrot, Malachitgrün, Aurin usw., tierische Farbstoffe wie Carmin u. a.

Mit Ausnahme des Berliner- und Turnbullsblau sind alle diese kompliziert konstituierten Farbstoffe krystalloider Natur.

Ferner adsorbieren diese Tone aus dem Urin, der Jauche, den Fäkalien den gelben und braunen Farbstoff, und die kolloiden, faulfähigen Substanzen, und aus dem Bier den aus dem Farbmalz stammenden braunen Farbstoff.

Sie besitzen demnach die Eigenschaft der Semipermeabilität[2]), und die Erscheinungen, die bei halbdurchlässigen Membranen auftreten, sind auch bei ihnen zu beobachten.

Schließlich erstreckt sich dieses Adsorptionsvermögen auch auf ausgeprägte Elektrolyte, oder deren Bestandteile; es gibt mindestens eine Ionenart, die adsorbiert wird.[3]) Aus Lösungen von sauren Kohlensauren und kohlensauren Salzen wird das HCO_3''-Ion und CO_3''-Ion vollständig, aus primären phosphorsauren Salzen das PO_4''-Ion zum Teil adsorbiert, während diese Tone andere Ionen Cl', Br', J', NO_3'', SO_4'' ungehindert diffundieren lassen.

Die Ursachen dieser Adsorption geben L. Michaelis und P. Rona nicht an, sie äußern nur die Vermutung, daß die

---

[1]) P. Rohland, Über die Adsorptionsfähigkeit der Hydroxyde des Siliciums, Aluminiums, Eisens. Zeitschr. f. anorgan. Chem. 56, 46, 1907.

[2]) P. Rohland, Die Tone als semipermeable Wände. Zeitschr. f. Elektrochemie 11, 28, 1905.

[3]) Zeitschr. f. anorgan. Chem. 1908 l. c.

Adsorption der Albumosen durch Kaolin ein Prozeß sei, der von der mechanischen Adsorption wesensverschieden sei.

Die Ursachen, daß diese Tone dieses eigentümliche Adsorptionsvermögen besitzen, sind die folgenden: sie bilden mit Wasser Substanzen im Kolloidzustand, die Hydroxyde des Siliciums, Aluminiums und Eisens und wahrscheinlich noch organische Stoffe.

Diese Stoffe aber weisen infolge ihres Kolloidcharakters eine zellartige Struktur auf; sie bilden ein zusammenhängendes, feinzelliges und verzweigtes Maschengewebe.

Es ist klar, daß dadurch die Oberfläche gegen die zu adsorbierende Lösung vergrößert wird; es haben sich zahllose Grenz- und Trennungsflächen gebildet, während bei einem dichten krystalloiden Körper nur eine solche Trennungsfläche existiert.

Je mehr solche Grenz- und Trennungsflächen vorhanden sind, um in so größerem Maße muß die Kraft, die W. Ostwald als Oberflächenenergie bezeichnet hat, sich betätigen.

Wenn kolloide Lösungen von koagulierten Substanzen zurückgehalten und adsorbiert werden, während krystalloide diffundieren, so beruht ersteres auf der Fähigkeit der Stoffe in diesen beiden Zuständen der Materie, sich zu scheinbaren Verbindungen zu vereinigen.

Man kann nach dem Vorgange von W. Nernst auf molekulartheoretischer Grundlage die Vorstellung sich machen, daß die Maschen des mit Wasser gefüllten, koagulierten Gewebes zu fein sind, um den größeren Kolloidmolekülen die Diffusion zu gestatten, diese daher festgehalten und adsorbiert werden, aber weit genug sind, um die kleineren Krystalloidmoleküle hindurchzulassen.

Was die krystalloiden, adsorbierten Farbstoffe anbetrifft, so haben Substanzen mit kompliziertem, molekularen Aufbau ganz besonders die Eigenschaft, sich an solchen Grenz- und Trennungsflächen zu konzentrieren; ein Farbstoff wird daher um so stärker adsorbiert, je komplizierter er konstituiert ist.

Hieraus erklärt sich auch der namentlich landwirtschaftlich vielfach bestätigte Satz, daß aus einer verdünnten Lösung weniger als aus einer konzentrierten adsorbiert wird,

auch wenn in beiden die Menge der gelösten Substanz gleich groß ist.[1])

Die relativ einfachere Zusammensetzung der verdünnten Lösung ist die Ursache; in einer verdünnten Salzlösung vom einfachsten Typus sind nur die betreffenden Ionen vorhanden, während in einer konzentrierten und komplizierter zusammengesetzten außer den Ionen sich noch nichtdissoziierte und komplexe Moleküle befinden.

Die Adsorption des Kohlensäure- und Phosphorsäureions ist vielleicht nur eine Begleiterscheinung des stets dabei stattfindenden Austausches der Alkalien in den kohlensauren Salzen gegen das in den Tonen enthaltene Calcium.

In allen Fällen spielt sich aber der Vorgang der Adsorption so ab, daß die aus den Tonen in Berührung mit Wasser gebildeten Hydroxyde zuerst kolloid gelöst, alsdann durch Elektrolytgegenwart oder Zusatz koaguliert werden, wobei sie die zu adsorbierenden Stoffe abfangen und in ihrem zellartigen Gehäuse festhalten.

Man kann auch diese Adsorptionen durch Tone als Spezialfälle der allgemeinen Regel ansehen, nach der jeder Stoff, der sich im festen, hier im koagulierten Zustande von der ihn umspülenden Lösung trennt, auf seiner Oberfläche und in den zunächst darunter befindlichen Schichten einen bald größeren, bald kleineren Teil des anderen Stoffes zurückhält.

---

[1]) P. Rohland, Über einige physikalisch-chemische Vorgänge in der Ackererde. Landwirtschaftl. Jahrbücher 1907, 473.

Zur Kenntnis der Desassimilation bei den Pflanzen.

Von

N. T. Deleano.

(Aus dem chemischen Laboratorium des kaiserlichen Instituts für experimentelle Medizin zu St. Petersburg.)

(Eingegangen am 15. März 1909.)

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich den Vorgang der Desassimilation von organischen und Mineralbestandteilen bei Sterigmatocystis nigra beschrieben. Aus den von mir erzielten Resultaten geht hervor, daß die das Mycelium bildenden Zellen nach Reife des Pilzes den größten Teil ihrer organischen und mineralischen Bestandteile dem Nährboden übergeben. Außerdem habe ich nachgewiesen, daß die stickstoffhaltigen Verbindungen bei der Desassimilation einer vollständigen Umwandlung unterliegen; es wurde konstatiert, daß das früher vorhandene Nitrat und der Ammoniakstickstoff verschwinden und der ausgeschiedene Stickstoff in anderer Verbindung erscheint. Das Ziel meiner weiteren Untersuchungen war das Verhältnis dieser Erscheinungen zu den von den Pilzen ausgeschiedenen Enzymen aufzuklären. Ich wählte zu diesem Zwecke den Lactarius Sanguifluus, welcher mir von Prof. Chodat (Genf) freundlichst zur Verfügung gestellt wurde und dessen physiologische und enzymatische Eigenschaften von E. Rouge[2]) ausführlich beschrieben worden sind.

Ich infizierte die Raulinsche Nährflüssigkeit reichlich mit Lactarius und bediente mich nach Rouge des Peptons als Stickstoffquelle.

Wasser 1500 ccm,
Sacchar Boerhavi 70 g,

---

[1]) Archiv biologitschiskich nauck 14, Heft 1/2, 1908 (russisch).
[2]) E. Rouge, Zentralbl. f. Bakter. u. Parasit. 18, 404, 1907.

Weinsäure 4 g,
Kaliumcarbonat 0,6 g,
Magnesiumcarbonat 0,6 g,
Kaliumphosphat 0,6 g,
Natriumsulfat 0,25 g,
Pepton Witte 3,95 g.

Nachher habe ich unternommen, zu verschiedenen Perioden der Entwicklung des Pilzes einerseits in der Nährflüssigkeit, anderseits im Mycelium Lipasebestimmungen auszuführen. In frischen Kulturen, welche in neutralisierter Nährflüssigkeit bei 37° C mit einer 1 %igen Monobutyrinlösung versetzt waren, fand ich nach 2, 8, 24 Stunden absolut keine Steigerung des Säuregrads, wogegen in alten Kulturen bei denselben Verhältnissen sich eine ziemlich kräftige Lipase bildete. Es mußte festgestellt werden, ist die in der Nährflüssigkeit nachgewiesene mit der in dem Pilz selbst vorhandenen Lipase identisch?

War die Nährflüssigkeit nur schwach gefärbt, so konnte die Lipasebestimmung direkt unternommen werden, war sie aber stark gefärbt, so mußte sie durch ein Gemenge von Talk und Magnesiumcarbonat filtriert und so entfärbt werden. Es sei erwähnt, daß Talk die diastatische Energie ein wenig schwächt. Nach Neutralisieren der entfärbten oder schwach gefärbten Nährflüssigkeit durch $^{n}/_{40}$-KOH goß ich 2, 4, 6 ccm derselben in Reagensgläser und fügte 2, 4, 6 ccm einer 1 %igen Monobutyrinlösung hinzu und stellte die Gläser auf 2 bis 8 Stunden in den Termostaten bei 37° C. Zur Bestimmung der freigewordenen Säure bediente ich mich einer $^{n}/_{40}$-KOH-Lösung mit 2 bis 3 Tropfen einer 1 %igen alkoholischen Phenolphthaleinlösung als Indicator.

Um die Lipase aus dem Pilz zu gewinnen, wurde derselbe mit gründlich ausgewaschenem Sand verrieben und bis zu einer homogenen teichartigen Masse mit neutralem Glycerin versetzt und auf 24 Stunden in den Termostaten bei 37° gestellt. Dann wurde ein gleiches Volumen Wasser hinzugefügt, filtriert, und so gelang es, eine mit der von E. Rouge beschriebenen vollständig identische Lipase zu gewinnen. Beim Vergleich der aus dem Pilz und der Nährflüssigkeit gewonnenen Lipasen erwies es sich, daß sie nicht identisch sind und daß es sich um zwei

verschiedene Diastasen handelt. Die aus der Nährflüssigkeit erhaltene Lipase besitzt folgende Eigenschaften:

1. Sie ist weniger resistent gegen Erhitzung.

2. Das Optimum ihrer Wirkung liegt bei einer höheren Temperatur (ein und dieselbe Steigerung des Säuregrads wurde im Laufe von 2 bis 8 Stunden bei einer Temperatur von 35° bis 50° erhalten.)

Durch Säuren wird ihre Wirkung verzögert, wogegen die aus dem Pilz gewonnene Lipase sich vollständig indifferent zur selben Quantität Säure verhält (sie ist gegen Säure resistent), und nur durch einen großen Überschuß derselben wird ihre fettspaltende Wirkung herabgesetzt (siehe folgende Tabelle).

Die Alkalien dagegen wirken auf beide Lipasen hemmend.

Versuch 1.

Die Wirkung von Säuren auf beide Lipasen.

2 ccm Enzym + 2 ccm 1%ige Monobutyrinlösung gaben nach 6 Stunden bei 37° C folgenden Säuregrad, welcher in millionsten Teilen eines Moleküls freier Buttersäure berechnet ist.

$^n/_{40}$-H_2SO_4	2 ccm Nährflüssigkeit + 2 ccm Monobutyrin	2 ccm aus dem Pilz extrahiertes Ferment + 2 ccm Monobutyrin
0	17	25
1 ccm	10	25
2 „	0	15

Versuch 2.

Die Wirkung von Alkalien.

$^n/_{40}$-NaOH	2 ccm Nährflüssigkeit + 2 ccm Monobutyrin	2 ccm aus dem Pilz extrahiertes Ferment + 2 ccm Monobutyrin
0	17	25
1 ccm	8	15
2 „	5	5

Die aus dem Pilz gewonnene Lipase ist gegen Erhitzen resistenter; um sie vollständig inaktiv zu machen, ist ein langdauerndes Sieden erforderlich. Das Optimum ihrer Wirkung

tritt bei 45° C ein. Das Verhalten zu künstlichen Fetten ist bei beiden Lipasen verschieden. Ich untersuchte die Wirkung der beiden Fermente auf Tributyrin $C_3H_5(OOC_4H_7)_3$. Es wurde durch starkes Schütteln mit Wasser eine 1 °/₀ Tributyrinemulsion bereitet und 2 ccm derselben mit beiden Lipasen versetzt auf 2 bis 8 Stunden in den Termostaten bei 37° C gestellt und dann durch eine $^n/_{40}$-KOH-Lösung mit Phenolphthalein als Indicator der Säuregrad bestimmt, welcher wie in Versuch 1 berechnet ist.

Tabelle I.

Die Dauer der Einwirkung	Das Ferment der Nährflüssigkeit		Das aus dem Pilz gewonnene Ferment	
	2 ccm Ferment + 2 ccm Tributyrin	4 ccm Ferment + 2 ccm Tributyrin	2 ccm Ferment + 2 ccm Tributyrin	4 ccm Ferment + 2 ccm Triyutyrin
2 Stunden	15	18	15	25
4 „	25	28	27	45
6 „	43	48	42	65
8 „	50	52	50	75

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß nicht konzentrierte Lösungen (2 ccm Ferment + 2 ccm 1 °/₀ Fettemulsion (Tributyrin) bei gleicher Dauer gleiche Quantitäten verseiften Fettes und folglich auch freier Säuren geben, daß bei Anwendung stärkerer Fermentquantitäten die Verseifung des Tributyrins unter der Wirkung der aus dem Pilz selbst gewonnenen Lipase energischer als mit der in der Nährflüssigkeit löslichen Lipase vor sich geht. Die Wirkung der beiden Lipasen auf eine Monobutyrinlösung bei gleicher Temperatur und gleicher Konzentration ist verschieden (siehe Tabelle II) wo der Säuregrad nach der Methode Hanriot und Camus[1]) in millionsten Teile eines Moleküls freier Buttersäure berechnet ist.

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Wirkung verschiedener Fettkonzentrationen auf beide Fermente, und es geht daraus deutlich hervor, daß die Steigerung des Säuregrads in keinem Verhältnis weder zum zugefügten Fett noch zum Ferment[2]) steht und daß ein geringer Überschuß des komplizierten Fettes gar keine Wirkung auf die Verseifung ausübt, ein großer Überschuß aber hemmend wirkt.

[1]) Compt. rend. Hanriot et Camus, 124, 235, 1897.

[2]) Siehe Tabelle I.

Tabelle II.

Die Dauer der Einwirkung	Das Ferment aus 2 ccm der Nährflüssigkeit			Das aus dem Pilz gewonnene Ferment in 2 ccm Glycerin		
	+ 2 ccm 1 % Monobutyrin	+ 4 ccm 1 % Monobutyrin	+ 6 ccm 1 % Monobutyrin	+ 2 ccm 1 % Monobutyrin	+ 4 ccm 1 % Monobutyrin	+ 6 ccm 1 % Monobutyrin
2	10	15	16	15	20	27
4	17	25	27	25	32,5	35
6	24	35	38	35	43,7	43
8	29	41	47	44	52,2	52

In Tabelle III ist das Verhältnis zwischen der Steigerung des Säuregrads und der Temperatur wiedergegeben.

Wir sehen, daß das Optimum der aus der Nährflüssigkeit stammenden Lipase zwischen 35° bis 50° C liegt, das Optimum der Pilzlipase aber bei 45° eintritt.

Die Lipase der Nährflüssigkeit, d. h. die lösliche Form, wird zwischen 60° bis 65° C zerstört, die des Pilzes bleibt aber bei 65° C noch aktiv und erst bei 70° C unterliegt sie der Zerstörung.

Tabelle III.
Die Spaltung des Fettes bei Temperatursteigerung.
Nr. 1 u. 2.

Die Dauer der Einwirkung	0°		10°		20°		30°		35°		40°	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2 Stunden	0	0	2	5	6	9	7	12	10	15	10	18
4 „	0	0	4	8	12	16	13	18	17	25	17	30
6 „	0	1,5	6	11	17	23	17	25	24	35	23	40
8 „	0	2,5	7	12	20	29	20	30	29	44	28	48

Die Dauer der Einwirkung	45°		50°		55°		60°		65°		70°	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2 Stunden	10	23	10	17	7	11	5	5	0	5	0	0
4 „	17	34	17	22	12	15	7	8	0	6	0	0
6 „	23	45	23	29	15	18	8	10	0	7	0	0
8 „	28	52	27	34	16	21	9	11	0	7	0	0

I Lipase der Nährflüssigkeit (nährflüssigkeitlösliche).
II Lipase aus dem Pilz gewonnen (glycerinlösliche).

Meine Untersuchungen führen mich zu folgenden Schlußfolgerungen:

Der Lactarius sanguifluus enthält zwei verschiedene Lipasen, eine dem Mycelium angehörige, im Nährboden unlösliche, welche durch Glycerin extrahiert wurde und der Serumlipase ähnlich ist, und eine zweite, welche von der Zelle des Mycels dem Nährboden übergeben wird und der pankreatischen Lipase oder dem Steapsin ähnlich ist.

Hanriot[1]) führt Unterschiede an, die den meinigen ziemlich nahe stehen. Er meint, daß die Lipase des Pankreas gewisssermaßen von der Temperatur unabhängig ist, das Optimum der Blutserumlipase aber zwischen 42° und 50° C eintritt; daß diese beiden Lipasen bei gleichen Temperaturen verschieden wirken und daß die Reaktion des Nährbodens einen verschiedenen Einfluß auf beide Lipasen ausübt.

Ich habe nachgewiesen, daß die Lipasen verschiedenen Ursprungs, speziell der Schimmelpilze, verschiedene Eigenschaften besitzen.[2])

In dem anderen Versuche bestimmte ich die Fettspaltungsfähigkeit des Pilzes nach der Fruchtbildung, d. h. in voller Reife, wo er, der jetzt dominierenden Meinung nach, am reichsten an Lipase ist. Ich fügte der Nährflüssigkeit 1°/₀ Monobutyrin hinzu und bestimmte nach 2 Wochen durch Titrieren den Säuregrad.

Hier war die Menge der Buttersäure stark gesteigert, aber ich konnte weder in der Nährflüssigkeit noch in dem Pilz die geringsten Spuren von fettspaltenden Enzymen nachweisen. Hieraus geht deutlich hervor, daß die Lipase allmählich zerstört wird; es ist möglich, daß die Verseifungsprodukte die Wirkung der Lipase hemmen und bei langdauerndem Einfluß sie vollständig vernichten.

---

[1]) Hanriot, Sur la répartition de la lipase dans l'organisme, Compt. rend. 123, 833, 1896.

[2]) N. T. Deleano, Archiv biologitschiskich nauck 13, 1907 (russisch).

Überführungsversuche mit Fermenten.

III. Die Malzdiastase.

Von

Leonor Michaelis.

(Eingegangen am 19. März 1909.)

Malzdiastase (Grübler) wurde in 2%iger wässeriger Lösung mehrere Tage gegen oft gewechseltes destilliertes Wasser dialysiert und diese Lösung 24 Stunden in das Stromgefälle gebracht. Ohne weiteren Zusatz, bei der Anordnung

+ Ag in ClNa	dest. Wasser	Ferment	dest. Wasser	Cu in $CuCl_2$

wanderte es stark kathodisch, gleichzeitig ließ sich aber regelmäßig auch in dem Anodengefäß eine kleine Menge Ferment nachweisen. Z. B.:

Stärkelösung mit gleichen Teilen Ferment bei 40°

a) aus dem Kathodengefäß nach 7 Minuten: hell gelbrote Jodreaktion.

b) aus dem Mittelgefäß nach 7 Minuten: keine Jodreaktion mehr;

c) aus dem Anodengefäß nach $1^3/_4$ Stunden: hellbraune Jodreaktion.

Bei saurer Reaktion[1])

+ Ag, ClNa	Essigsäure 1 : 200	2% Fermentlösung $+ \frac{1}{200}$ Vol. Eisessig	Essigsäure 1 : 200	Cu, $CuCl_2$

enthielt außer dem Mittelgefäß auch das Kathodengefäß reichlich Ferment, niemals aber das Anodengefäß.

---

[1]) Vor der Prüfung der Fermentwirkung wurden die Flüssigkeiten wieder gegen Lackmus neutralisiert, bzw. spurweise sauer gemacht.

Bei alkalischer Reaktion[1])

+ Ag, ClNa	0,2 % Soda-lösung	2 % Ferment, 0,2 % Sodalösung	0,2 % Soda-lösung	Cu in $CuCl_2$

wanderte das Ferment dagegen ausschließlich nach der Anode.

Im undialysierten Zustand wanderte das käufliche Ferment ausschließlich kathodisch.

Es ist also die Diastase ein amphoterer Körper, und das deckt sich mit den Resultaten der Adsorptionsanalyse. In diesem Falle ist die Kongruenz ganz besonders gut. Kaolin adsorbierte Diastase nur bei saurer Reaktion, wo sie nach dem positiven Pol wandert, nicht aber bei alkalischer Reaktion, wo sie elektronegativ ist. Die Diastase unterscheidet sich von dem ebenfalls amphoteren Trypsin dadurch, daß sie stärker positiv, dieses stärker negativ ist. Um Trypsin zu positivieren, bedarf es erheblich saurer Reaktion, während Diastase schon bei neutraler Reaktion positive Eigenschaften zeigt.

Wir sahen nun, daß es sowohl beim Trypsin wie bei der Diastase eine ganz bestimmte Bedingung gibt, bei der die Wanderung doppelsinnig ist, während ein Stillstand des Ferments im Strom, wie ihn Pauli für Eiweiß in neutraler Lösung beschreibt, noch nicht beobachtet wurde. Hierin steckt ein Problem bezüglich der Wanderung amphoterer Substanzen, das sich noch nicht allgemein beantworten läßt. Beim Trypsin glaubte ich dieses Verhalten auf die Gegenwart von Elektrolyten beziehen zu dürfen, deren Wanderung im Strom lokale Reaktionsänderungen hervorrufen könne. Da aber für die Diastase die Bedingung für die doppelsinnige Wanderung gerade die neutrale und elektrolytfreie Lösung ist, so erscheint diese Deutung zweifelhaft.

IV. Pepsin (Fortsetzung).

Die früher kurz mitgeteilten Befunde über Pepsin bedürfen einer Ergänzung. Die bisherige Anordnung des Apparates genügt nämlich noch nicht, um bei Gegenwart größerer Mengen HCl die Reaktion beim Stromdurchgang gleich zu halten. Bei der Anordnung

[1]) Vgl. S. 231 Note 1.

+ Ag in ClNa	HCl	Ferment HCl	HCl	Cu in $CuCl_2$
I	II	III	IV	V

wandert H^+-Ion in der Richtung II ⟶ III ⟶ IV, und in dem Maße, wie es nach rechts wandert, wird es durch Nachrücken von Na^+ aus I substituiert; die Acidität nimmt daher ab. Das macht sich bei Anwendung höherer HCl-Konzentrationen besonders bemerkbar, wo die Stromintensität eine beträchtliche ist. Man kann nun diesen Übelstand einigermaßen dadurch ausschalten, daß man I statt mit ClNa mit einer starken HCl-Lösung füllt. Die Gefahr, daß diese durch Diffusion in das Gefäß II gelangt, ist bei der Anordnung des Apparats kaum zu befürchten, da der Diffusionsweg von dem Kugelgefäß des seitlichen Stutzens bis in das Gefäß II sehr weit ist. Dagegen wird auf diese Weise erreicht, daß bei genügendem HCl-Vorrat in I die von II nach III nach IV fortwandernden H-Ionen durch elektrische Überführung wieder ersetzt werden. So kann man auch bei höheren HCl-Konzentrationen der Gefäße II, III, IV einigermaßen die Reaktion konstant halten. Da das wandernde Ferment selbst ein gewisses Säurebindungsvermögen besitzt, so ist diese Konstanz nur eine angenäherte, aber auch so gestatten die Resultate schon einen halbquantitativen Einblick in die Verhältnisse.

Das Pepsin wanderte nämlich bei einem HCl-Gehalt der Gefäße II, III und IV von

1. 0 anodisch,
2. $^1/_{400}$ norm. anodisch und kathodisch,
3. $^1/_{200}$ norm. anodisch und kathodisch,
4. $^1/_{200}$ norm. anodisch und kathodisch,
5. $^1/_{50}$ norm. kathodisch,
6. $^1/_{40}$ norm. kathodisch.

Es ist somit auch beim Pepsin die Umkehrung der Ladung durch Säurezusatz erwiesen und damit völlige Übereinstimmung mit der Adsorptionsanalyse hergestellt.

Es ist nun bemerkenswert, daß es einer sehr merklichen sauren Reaktion bedarf, um das Pepsin entschieden kathodisch zu machen, ebenso wie es auch sehr entschieden saurer Reaktion bedarf, um die proteolytische Wirksamkeit des Pepsins zu entfalten. Wir können daraus schließen, daß nur das kathodische

Pepsin proteolytisch wirkt. Wenn wir nun bedenken, daß das Substrat des Pepsins, das spaltbare Eiweiß, bei so saurer Reaktion ebenfalls sicher rein kathodisch ist, so ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß zwischen dem Ferment und dem Substrat nicht etwa eine elektrische Gegensätzlichkeit besteht.

Es ist nun häufig auf die Beziehung vom Lab zum Pepsin hingewiesen worden. Ohne auf die zahlreiche Literatur einzugehen (ich verweise auf M. Jacoby[1]), neigt man im allgemeinen der Ansicht zu, wegen der Unmöglichkeit, die beiden Fermente voneinander zu trennen, daß die Pepsin- und die Labwirkung zwei verschiedene Wirkungen desselben Fermentes unter verschiedenen Bedingungen seien. Wenn wir nun bedenken, daß die Labwirkung bei neutraler Reaktion stattfindet, wo das Pepsin anodisch ist, so ist die Hypothese nicht unbegründet, daß anodisches Pepsin Labwirkung, kathodisches Pepsin proteolytische Wirkung hat.

---

[1]) Diese Zeitschr. 1.

Über Löslichkeitsbeeinflussung von Elektrolyten durch Eiweißkörper. I.

Von

Wolfgang Pauli und Max Samec.

(Aus der biologischen Versuchsanstalt in Wien, Physikalisch-chemische Abteilung.)

(Eingegangen am 19. März 1909.)

Die innigen Wechselbeziehungen der Biokolloide und Elektrolyte finden ihren Ausdruck in den physikalisch-chemischen Zustandsänderungen, welche die einen durch die Anwesenheit der anderen erfahren. Wiewohl es sich nach den neueren Untersuchungen hier im Grunde nur um ein einziges Untersuchungsobjekt — den beim Zusammenbringen von Kolloiden und Elektrolyten entstehenden neuen Komplex — handeln dürfte, sind die vorliegenden Arbeiten meist den Änderungen in der einen (Kolloid) oder anderen (Elektrolyt) Richtung gewidmet. Diese Trennung läßt sich einigermaßen nicht nur durch die verschiedenartige biologische Bedeutung dieser Veränderungen, sondern auch mit methodischen Gründen rechtfertigen. Während beispielsweise die von Alkalisalzen, und zwar selbst von kleinen Mengen[1]) am Eiweiß hervorgebrachten Zustandsänderungen höchst auffällig und auch der quantitativen Messung unschwer zugänglich sind, werden die physikalisch-chemischen und analytischen Methoden häufig unzureichend, sobald man darauf ausgeht, die Veränderungen unmittelbar zu messen, welche an einem Elektrolyten infolge der Zugabe von Eiweißkörpern eintreten. Die wichtigste Ursache für diese verschiedene methodische Zugänglichkeit ist das große Mißverhältnis in den Mole-

---

[1]) Pauli und Handowsky, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 415, 1908.

kulargewichten von Protein und Elektrolyt, wodurch die in Reaktion tretende Menge des letzteren so gering werden kann, daß sie sich an der Grenze der Nachweisbarkeit bewegt. Dies gilt vor allem für die Beziehungen von Eiweißkörpern und Salzen, welche bisher mit Erfolg nur einseitig durch Beobachtungen der Zustandsänderungen der Eiweißkörper studiert werden konnten.[1]) Die Ergänzung dieser Beobachtungen von der anderen Seite her ist aber nicht nur zur Sicherung der Ergebnisse wünschenswert, sondern sie kann unter Umständen auch einen tieferen Einblick in die Funktion der Elektrolyte im Organismus gewähren und neue Eigentümlichkeiten in ihrem biologischen Verhalten aufdecken.

Eine hierhergehörige Frage von großer Bedeutung ist nun die nach der Löslichkeitsbeeinflussung[2]) der Elektrolyte durch Biokolloide, insbesondere durch die Eiweißkörper. Man war bisher geneigt, für die Löslichkeit der Elektrolyte in den tierischen und pflanzlichen Säften und Geweben ausschließlich das anwesende Wasser als maßgebend zu betrachten, und die wenigen vorliegenden Arbeiten dieser Richtung haben ohne weiteres die für wässerige Lösung gefundenen Resultate auf die Verhältnisse im Organismus übertragen. Diese Übertragung wird im Prinzipe mit einem geringen Fehler behaftet sein, wenn es sich um sehr leicht lösliche Stoffe handelt. Solche sind in den Geweben und Flüssigkeiten der Lebewesen sehr weit von der Sättigung entfernt, und schon deshalb wird hier eine Abänderung der für Wasser ermittelten Löslichkeit durch die anwesenden Biokolloide im allgemeinen praktisch wenig ins Gewicht fallen. Anders bei den schwer löslichen Elektrolyten, welchen übrigens mit Rücksicht auf ihre Schwerlöslichkeit spezielle Funktionen im Organismus zukommen. Es braucht ja nur an die Bedeutung der Kalksalze für die Schalen- und Skelettbildung im Tierreiche, an die der Silicate im Pflanzenreiche und an das Interesse des Pathologen für die Kalk- und Uratablagerungen erinnert zu werden. In allen diesen Fällen handelt es sich um das Zusammentreten von Ionen niedrigen Löslichkeitsproduktes zu neutralen Teilen, die

[1]) Vgl. z. B. für Gelatine Wo. Ostwald, Pflügers Archiv 111, 581.

[2]) Rothmunds Monographie, Löslichkeit und Löslichkeitsbeeinflussung, Leipzig 1907, bietet eine vorzügliche und sehr vollständige Darstellung des ganzen Gebietes.

an Punkten der Übersättigung ausfallen. Von Kationen ist hier in erster Reihe das Calcium, von Anionen vor allem das Schwefelsäure-, Phosphorsäure-, Oxalsäure- und Kohlensäure-Ion zu berücksichtigen. Außerdem wird die wohl hydrolytisch freigesetzte schwer lösliche Harnsäure und Kieselsäure in Frage kommen. Aus diesen Substanzen wurden für das Studium ihrer Löslichkeitsbeeinflussung durch Eiweißkörper vorläufig einige ausgewählt und die Resultate mit dem Verhalten von leicht löslichen Salzen in Anwesenheit von Proteinstoffen verglichen.

Experimenteller Teil.

Die verwendeten Salze wurden mit dem Lösungsmittel im Erlenmeyerkolben zusammengebracht, die Kolben mit Kautschukstopfen und einer Gummikappe verschlossen und mittels eines Halters auf der Horizontalwelle eines Ostwaldschen Thermostaten befestigt. Die Umdrehungsgeschwindigkeit der Welle betrug durchschnittlich 50 bis 60 Touren pro Minute. Sämtliche Bestimmungen sind bei 25° C durchgeführt, wobei die Temperatur während des ganzen Versuches in der Regel um nicht mehr als $\pm 0,1^\circ$ schwankte. Nach 6 bis 7 Stunden wurde dem Gemisch eine Probe zur Analyse entnommen, ein bis zwei Proben nach weiteren 2 Stunden. Zumeist war jedoch das Gleichgewicht nach 6 Stunden erreicht.

Als kolloides Lösungsmittel wurde bei jedem Salze ein durch 8 wöchentliche Dialyse und mehrmonatliches Absetzen möglichst entaschtes und wasserklar abfiltriertes Rinderserum zumeist vom N-Gehalte 0,371 % entsprechend ca. 2,23 % Eiweiß verwendet. Bei den meisten Stoffen wurde auch die Löslichkeit in Gelatine (bei leicht löslichen von 4 und 10 %, bei schwer löslichen wegen der großen Viscosität nur von 1,5 % Leimgehalt) untersucht. Zum Vergleiche wurde auch von jedem Salze der Gehalt einer wässerigen, bei 25° C gesättigten Lösung bestimmt. Das zur Lösung verwendete Wasser war zweimal aus Metallapparaten destilliert und durch Durchstreichen von Luft nach Möglichkeit von CO_2 befreit worden.

Zur Bestimmung der leicht löslichen Salze genügten 25 bis 30 ccm der Lösung, während bei den schwer löslichen Stoffen 200 ccm Lösung für eine Bestimmung als die unterste Grenze gelten mußten. Die kleinen für die Analyse der leicht löslichen

Elektrolyte nötigen Proben wurden mittelst besonderer 10 ccm-Pipetten den Gefäßen entnommen. Diese Pipetten hatten am oberen engen Rohre einen seitlichen Ansatz, welcher ebenso wie der Pipettenhals einen Glashahn trug. Die ganze Pipette befand sich in einem weiteren Gefäß, dessen Boden das untere Ende der Pipette gedichtet durchsetzte. Das Gefäß war ständig mit Thermostatenwasser durchströmt. Über die untere Mündung der Pipette wurde ein 3 cm langer Gummischlauch geschoben, in welchem sich als Filtermaterial gewaschene, lufttrockene Baumwolle befand. Durch Verbindung des Seitenansatzes der Pipette mit der Luftpumpe konnte unter Vermeidung von Schaumbildung die Füllung vorgenommen werden und nach Aufhebung der Verbindung mit dem Vakuum und Abnahme des Filterschlauches durch Öffnen des Halshahnes die klare Lösung in vorgewogene Wägegläschen abgelassen werden, deren Gewicht hierauf neuerlich bestimmt wurde.

Die größere Menge des Lösungsmittels, welche zu der Bestimmung der schwer löslichen Stoffe nötig war, erforderte eine Modifikation der eben beschriebenen Arbeitsmethode. Als Filtermaterial wurde mit gleich gutem Erfolge Asbest oder Papier verwendet, von denen das erstere in Glasröhren, das letztere in Nutschen untergebracht war.

Die Filter waren in dreihalsige Woulffsche Flaschen eingesetzt, die außerdem mit zwei Glashähnen armiert waren zur bequemen Verbindung mit dem Vakuum und Aufhebung desselben. Das ganze System wurde nach sorgfältigster Dichtung im Thermostaten untergetaucht. In einzelnen Fällen war es nötig, die Lösung zweimal zu filtrieren. Vom klaren Filtrat wurde dann eine geeignete Menge für eine Bestimmung verwendet.

Zur Auswertung der gelösten Stoffmenge wurden die gewogenen Lösungen der leicht löslichen Salze auf ein bestimmtes Volumen verdünnt und in aliquoten Teilen titrimetrisch die Menge des Anions ermittelt.

Die Menge der schwer löslichen Stoffe wurde — Harnsäure ausgenommen — durch Eindampfen und Veraschen gefunden. Dabei mußte vom Gesamt-Glührückstand der Aschengehalt des Lösungsmittels abgezogen werden. Bei Serum ist der Salzgehalt außerordentlich gering (0,005 g auf 100 g Serum), erreicht aber bei der 1,5%igen Gelatine Werte zwischen 0,036 bis 0,044 g

pro 100 g, ein Gehalt, welcher die gelösten Salzmengen beträchtlich übersteigt.

A. Verhalten einiger leicht löslicher Salze.

Als leicht lösliche Salze wurden die Eiweiß nicht fällenden Ammonchlorid, Magnesiumchlorid[1]) und Ammoniumrhodanid ausgewählt. Zur Bestimmung der Chloride wurde das Cl-Ion titrimetrisch mit Hilfe von $^{n}/_{10}$-Silberlösung und Kaliumchromat als Indikator ausgewertet. Viele Versuche zeigten, daß wegen der Fällung der Eiweißkörper hier die Färbung des Silberchromats etwas später bemerkbar wird als bei Lösungen in reinem Wasser. Die Eiweißlösungen allein gaben mit Silbernitrat kein Halogensilber. Bei einer Reihe von Vorversuchen fand sich in gleich verdünnten Eiweißlösungen ein mittlerer Fehler der Bestimmungsmethode von $+1\,^0/_0$. Es wurden daher die in gleichartig verdünnten Serum- oder Leimlösungen gefundenen Cl-Werte um $1\,^0/_0$ verringert. Die Versuchsergebnisse sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt, aus welchen die leider nicht geringe Breite der Titrationsfehler ersichtlich ist. Es mußte deshalb stets aus einer großen Reihe von Bestimmungen das Mittel genommen werden. Die Zahlen bedeuten, wie es meist bei Löslichkeitsmessungen üblich, die in 100 g Lösung enthaltene Salzmenge in Grammen. Das Lösungsmittel ist an der Spitze jeder Vertikalreihe angeführt.

I. Ammoniumchlorid.

	Wasser	Serum	$4\,^0/_0$ Gelatine	$10\,^0/_0$ Gelatine
	28,40	28,19	27,75	26,74
	28,40	28,26	27,86	26,78
	28,65	27,82	27,74	
	28,63	28,33	28,02	
	28,29	28,40	27,7	
	28,44	28,22	27,9	
	28,59	28,29	—	
	28,49	28,13	—	
korrigierter Mittelwert	28,49	27,9	27,55	26,48

[1]) Es finden sich gelegentlich Sera, welche bei sehr hohen Magnesiumchloridkonzentrationen eine feine Trübung zeigen, die bei Sättigung mit dem Salze völlig zurückgeht. Diese Erscheinung, welche an die interessanten Beobachtungen von Porges und Neubauer über das Verhalten von Lecithinemulsionen gegen Magnesiumsalze (diese Zeitschr. 7, 152, 1908) erinnert, könnte von den Serumlipoiden abhängig sein.

II. Magnesiumchlorid.

	Wasser	Serum	4 % Gelatine	10 % Gelatine
	36,05	35,89	35,55	35,68
	35,92	36,05	35,62	35,27
	35,92	35,92	35,61	
	35,90	35,80	35,56	
	36,10	35,71		
	36,02	35,61		
	35,70	36,15		
korrigierter	35,88	35,86		
Mittelwert	35,94	35,51	35,22	35,13

Zur Bestimmung des in Lösung gehaltenen Rhodanammoniums wurde die Probe mit einer gemessenen Menge Silbernitrat im Überschuß versetzt und dann dieser Überschuß mit $^n/_{10}$-Rhodanammonlösung (Ferroammonsulfat und Salpetersäure als Indikator) zurücktitriert. Eine große Anzahl von Versuchen zeigte, daß bei dieser Arbeitsmethode ein besonderer Einfluß des gefällten Eiweißes auf das Auftreten der Färbung nicht zu beobachten ist, weshalb eine Korrektur der gefundenen Werte sich erübrigte.

III. Ammoniumrhodanid.

	Wasser	Serum	4 % Gelatine	10 % Gelatine
	63,05	62,06	61,99	58,54
	63,11	62,39	61,16	59,29
	62,76	61,57	62,39	
	62,34	62,21	60,78	
	62,84	62,43	61,12	
	61,59	61,45	61,35	
	62,09	62,45	—	
	61,89	61,82	—	
Mittelwert	62,46	62,06	61,46	58,92

Sämtliche untersuchten leicht löslichen Salze zeigen eine geringe aber regelmäßig nachweisbare Herabsetzung ihrer Wasserlöslichkeit bei Anwesenheit von Eiweißkörpern.

B. Schwerlösliche Elektrolyte.

Zur Untersuchung kamen das Sulfat, tertiäre Phosphat und Carbonat des Calciums, außerdem Kieselsäure und Harnsäure.

IV. Calciumsulfat.

Das Calciumsulfat wurde nach dem Eindampfen und Veraschen des Lösungsmittels schwach geglüht und als wasserfreies Salz gewogen.

	Wasser	Serum	1,5 % Gelatine
	0,234	0,229	0,293
	0,227	0,209	0,319
	0,211	0,231	0,274
	0,217	0,234	0,295
	0,199	0,232	0,300
	0,229	0,220	0,290
	0,229	—	—
	0,239	—	—
Mittelwert	0,228	0,226	0,295

Gramm Calciumsulfat in 100 g Lösung.

V. Tertiäres Calciumphosphat.

Das $Ca_3(PO_4)_2$ wurde durch Eindampfen und Glühen bis zur Gewichtskonstanz bestimmt.

	Wasser	Serum	1,5 % Gelatine
	0,009	0,020	0,023
	0,008	0,020	0,020
	0,012	0,023	0,014
	0,014	0,020	0,016
	0,009	0,019	0,016
	0,013	0,023	0,018
Mittelwert	0,011	0,021	0,018

Gramm Calciumphosphat in 100 g Lösung.

VI. Calciumcarbonat.

Das Calciumcarbonat wurde durch starkes Glühen in das Oxyd übergeführt und dieses gewogen.

	Wasser	Serum	1,5 % Gelatine
	0,004	0,020	0,018
	0,003	0,023	0,015
	0,004	0,023	0,013
	0,005	0,025	0,017
	0,003	0,025	0,013
	0,005	0,021	0,015
Mittelwert	0,004	0,023	0,015

Gramm Calciumcarbonat in 100 g Lösung.

VII. Kieselsäure.

Für die Untersuchungen der Kieselsäure verwendeten wir ein vorrätiges schönes de Haensches Präparat. Da diese Kieselsäure beim Glühen noch viel Wasser verlor, wurde die Asche auf dem Gebläse bis zur Gewichtskonstanz erhitzt.

	Wasser	Serum	1,5 % Gelatine
	0,026	0,029	0,025
	0,025	0,033	0,027
	0,022	0,028	0,031
	0,021	0,029	0,026
	0,026	0,032	0,028
	0,020	0,029	0,026
Mittelwert	0,023	0,030	0,027

Gramm feuerbeständige Kieselsäure in 100 g Lösung.

VIII. Harnsäure.

Die Menge der gelösten Harnsäure wurde aus der Differenz des nach Kjeldahl ermittelten Stickstoffgehaltes der Lösung und des Lösungsmittels gerechnet. Die nachfolgende Tabelle enthält die einzelnen Stickstoffwerte der wässerigen, resp. Serumlösung. Der mittlere N-Gehalt dieses Serums (0,241 %) wurde von dem Mittelwerte der Harnsäure-Serumlösung subtrahiert. Der Harnsäurestickstoff multipliziert mit 3 ergab die Harnsäure. Zum Vergleich wurden auch einige gravimetrische Harnsäurebestimmungen in der wässerigen Lösung ausgeführt.

	Wasser		Serum	
	0,015		0,251	
	0,011		0,261	
	0,016		0,258	
	0,013		0,266	
Mittel	0,014 g	N	0,260 g	N
oder	0,042 g	Harnsäure	—0,241 „	„
gravimetrisch	0,040 „	„	0,019 „	„
bestimmt	0,039 „	„	0,057 g	Harnsäure pro
Gesamtmittelwert	0,040 g			100 g Lösung.

Sämtliche untersuchten schwerlöslichen Elektrolyte erfahren eine zum Teil sehr beträchtliche Erhöhung ihrer Löslichkeit bei Anwesenheit von Eiweißkörpern.

C. Einstellung des Lösungsgleichgewichtes von der anderen Seite.

Bei allen bisher mitgeteilten Versuchen wurde das zu untersuchende Präparat direkt mit dem Lösungsmittel zusammengebracht und bis zur Herstellung des Gleichgewichtes geschüttelt. Da es vor allem mit Rücksicht auf die biologischen Verhältnisse von großem Interesse war, auch von der anderen Seite die Gleichgewichtsbedingungen aufzusuchen, wurden die drei schwerlöslichen Calciumsalze durch Wechselsubstitution in der Lösung gebildet. Zu diesem Zwecke wurde eine $\frac{2n}{3}$-Calciumchloridlösung mit Wasser, Serum oder 1,5 % Gelatine bereitet und zu einer gemessenen Menge dieser Mischung so lange $^n/_{10}$-Na_2SO_4, bzw. $^n/_{100}$-Na_2CO_3 oder $^n/_{100}$-Na_3PO_4 in dem gleichen Lösungsmittel unter beständigem Rühren zugesetzt, bis eine eben sichtbare Trübung auftrat. Zur Beobachtung der Trübung wurden im verdunkelten Raume je ein Reaktions- und ein Vergleichsgefäß von einer starken Lichtquelle beleuchtet. Aus der Menge der zugesetzten Lösung wurde die in Lösung gehaltene Menge des neugebildeten Salzes gerechnet, dann die Mischung geschüttelt und schließlich das gelöste Salz gravimetrisch bestimmt. Nach dreistündiger Bewegung waren Löslichkeitswerte erreicht, welche ganz den in den früheren Tabellen (IV bis VI) angeführten entsprachen. Verschieden von diesen sind die im Augenblicke der ersten Trübung in Lösung gehaltenen Salzmengen, wie die Daten der folgenden Tabellen, bezogen auf 100 ccm Lösung, zeigen.

Die auf 100 g Lösung bezogenen definitiven Gleichgewichtswerte sind zum Vergleiche daruntergesetzt.

IX. Calciumsulfat.

5 ccm $\frac{2n}{3}$-$CaCl_2$-Lösung geben eine Trübung nach Verbrauch von ccm $^n/_{10}$-Na_2SO_4.

	Wasser	Serum
	1,90	2,15
	2,05	2,10
	2,00	1,90
	1,95	2,00
Mittel	1,97 ccm	2,04 ccm $^n/_{10}$-Na_2SO_4

entsprechend 0,272 g $CaSO_4$ in 100 ccm Lösung.	entsprechend 0,277 g $CaSO_4$ in 100 ccm Lösung.

Definitives Gleichgewicht:

0,223 g	0,226 g.

X. Calciumphosphat.

5 ccm $\frac{2n}{3}$-$CaCl_2$-Lösung geben eine Trübung nach Zusatz von ccm $^n/_{100}$-, bzw. $^n/_{10}$-Na_3PO_4.

	Wasser	Serum	1,5 % Gelatine
	2,5	2,5	0,8
	2,3	2,4	0,7
	2,4	2,5	0,7
	2,3	2,5	0,8
Mittel	2,4 ccm $^n/_{100}$-Na_3PO_4	2,5 ccm $^n/_{100}$-Na_3PO_4	0,75 ccm $^n/_{10}$-Na_3PO_4
Gramm $Ca_3(PO_4)_2$ in 100 ccm Lösung.	0,0496 g	0,0516 g	0,1549 g
Definitives Gleichgewicht	0,011 g	0,021 g	0,018 g

XI. Calciumcarbonat.

5 ccm $\frac{2n}{3}$-$CaCl_2$-Lösung geben eine Trübung nach Verbrauch von ccm $^n/_{100}$ bzw. $^n/_{10}$ Na_2CO_3.

	Wasser	Serum	1,5 % Gelatine (gab nur keine Trübung mit Na_2CO_3)
	1,2	6,2	0,4
	1,6	5,5	0,5
	1,4	6,0	0,5
	1,4	6,5	0,4
Mittel	1,4 ccm $^n/_{100}$-Na_2CO_3	6,0 ccm $^n/_{100}$-Na_2CO_3	0,45 ccm $^n/_{10}$-Na_2CO_3
Gramm $CaCO_3$ in 100 ccm Lösung	0,014 g	0,06 g	0,045 g
Definitives Gleichgewicht	0,004 g	0,023 g	0,015 g

Auch bei der Erreichung des Lösungsgleichgewichtes von der anderen Seite her tritt in jedem Stadium des Vorganges die bedeutende Löslichkeitsvermehrung der untersuchten schwerlöslichen Salze bei Anwesenheit von Eiweißkörpern hervor. Dagegen ist eine relative Be-

förderung der anfänglichen Löslichkeitsüberschreitung dieser Substanzen, welche auch im Wasser sehr beträchtliche Grade erreichen kann, im Serum nicht nachweisbar, wenigstens nicht für die verwendeten Eiweißkonzentrationen. Wohl aber läßt die zähere Gelatine eine deutliche Beförderung der Löslichkeitsüberschreitung im Vergleiche mit Wasser erkennen.

So erscheint in statu nascendi des schwerlöslichen Salzes die Löslichkeit des Calciumphosphates in Wasser 4,6 mal, in unserer Gelatine 8,6 mal erhöht und die des Carbonates in Wasser 3,5fach, in Gelatine 5fach gesteigert.

Theoretischer Teil.

Die aus den angeführten Beobachtungen sich ergebende Tatsache, daß Eiweißkörper die Löslichkeit stark wasserlöslicher Salze herabzusetzen, die von schwer löslichen Elektrolyten hingegen, und zwar in recht beträchtlichem Ausmaße, zu erhöhen vermögen, wirkt zunächst sehr überraschend. Sie findet jedoch, wie sich zeigen läßt, eine sehr einfache Aufklärung in dem Umstande, daß bei der Löslichkeitsbeeinflussung der Elektrolyte durch Eiweißkörper wenigstens zwei entgegenwirkende Faktoren in Wirksamkeit treten, von denen je nach der Löslichkeit des Elektrolyten bald der eine, bald der andere für das Endergebnis den Ausschlag gibt.

Der Löslichkeit erniedrigende Umstand ist die teilweise Substitution von Wasser durch den Proteinstoff in den Lösungen. Die dem gelösten Elektrolyten zur Verfügung stehende Wassermenge wird zumindest um das in der Gewichtseinheit Lösung enthaltene Eiweißgewicht verringert.

Bezieht man, wie dies üblich, die Salzbestimmungen auf 100 g Lösung und sieht man davon ab, daß die Eiweißkörper infolge ihrer Quellung ein gewisses Wasserquantum dem Elektrolyten als Lösungswasser entziehen können, so ist in unserem Serum eine Löslichkeitserniedrigung von etwa 2%, in unserer Gelatine je nach der gewählten Konzentration 1,5, oder 4% zu erwarten.

In den folgenden Tabellen sind die an den leicht löslichen Salzen gefundenen Werte in verschiedener Weise berechnet.

XII. Löslichkeit in Serum.

1	Löslichkeit in		4	5	6	Auf wasserfreies Salz bezogene Werte von	
Salz und Äquivalentgewicht m	2 Wasser l_w	3 Serum l_s	$\frac{l_w}{m} \cdot 10$	$\frac{l_w - l_s}{l_w} \cdot 100$	$\frac{l_w - l_s}{m}$	7 $\frac{l_w - l_s}{m}$	8 $\frac{l_w - l_s}{l_w} \cdot 100$
NH_4Cl m = 53,5	28,49	27,92	5,325	2,0007 %	0,01065	0,01065	2,0007 %
$MgCl_2$ m = 47,68	35,94	35,51	7,5376	1,1965 %	0,009018	0,02395	3,178 %
NH_4CNS m = 76	62,46	62,06	8,218	0,6404 %	0,005263	0,00782	0,96945 %

XIII. Löslichkeit in 4 % Gelatine.

1	2	3	4	5	Auf wasserfreies Salz bezogen	
Salz	l_w	l_g	$\frac{l_w - l_g}{l_w} \cdot 100$	$\frac{l_w - l_g}{m}$	6 $\frac{l_w - l_g}{m}$	7 $\frac{l_w - l_g}{l_w} \cdot 100$
NH_4Cl	28,49	27,55	3,299 %	0,01761	0,01761	3,299 %
$MgCl_2$	35,94	35,22	2,0033 %	0,01510	0,04018	5,321 %
NH_5CNS	62,46	61,46	1,601 %	0,013156	0,01955	2,3794 %

Aus den Tabellen XII und XIII ergibt sich, daß die Wasserlöslichkeit der untersuchten Salze (l_w) in der Reihe Ammoniumchlorid, Magnesiumchlorid und Ammoniumrhodanid wächst und daß höchstens eine ca. 5 bis 8 normale stabile wässerige Lösung (Reihe 4, Tabelle XII) derselben bereitet werden kann. Während NH_4Cl nahezu wasserfrei zur Verwendung kam, bedurften die Werte für die Löslichkeitserniedrigung der wasserhaltigen Salze $MgCl_2$ und NH_4SCN durch Eiweiß einer Korrektur. Das mit den Salzen in die Eiweißlösung eingebrachte Wasser verdünnt dieselbe und verringert dadurch die vom Eiweiß hervorgebrachte Löslichkeitsänderung (l_s bzw. l_g). Unter der Voraussetzung, daß die Löslichkeitsbeeinflussung durch das Eiweiß innerhalb der hier gegebenen Schwankungen — beim Serum 1 bis 2 %, bei der Gelatine 2 bis 4 % — dem Eiweißgehalte proportional bleibt, läßt sich die absolute und relative Löslichkeitserniedrigung auf den gleichen Eiweißgehalt (oder auf wasserfreies Salz) reduzieren. Der Wassergehalt des Magnesiumchlorids wurde aus dem Krystallwasser, der des stark hygroskopischen Am-

moniumrhodanids durch Vergleich von gewogener und titrierter Menge als rund 20 % ermittelt. So ergaben sich die zwei letzten Vertikalreihen der Tabellen.

Sowohl die absolute als auch die relative Löslichkeitserniedrigung von NH_4Cl und $MgCl_2$ entsprach wenigstens der Größenordnung nach den Erwartungen. Sie lag für Serum etwa zwischen 2 und 3 %, für die 4 % Gelatine zwischen 3 und 5 %. Nur die Werte für Ammoniumrhodanid bleiben beträchtlich zurück,*) etwas unter der Hälfte der theoretisch zu erwartenden Löslichkeitserniedrigung.

Bei den untersuchten leicht löslichen Salzen, die gesättigte 5 bis 8 normale Lösungen bilden, treten die durch Anwesenheit von Eiweißkörpern gegebenen Löslichkeit erhöhenden Umstände praktisch mehr oder minder stark zurück. Das wichtigste die Löslichkeit eines Elektrolyten steigernde Moment ist hier die Bildung von Salzioneneiweißkomplexen, deren Existenz nicht nur bei Globulinen [Pauli[1]) Hardy[2])], sondern auch bei wasserlöslichen Eiweißkörpern [Pauli und Handowsky[3])] erwiesen ist.

Aus den Daten von Pauli und Handowsky und aus noch weiter zu veröffentlichenden Versuchen über Salzeiweißverbindungen kann die in ca. 2 % Serumeiweißlösungen gebundene Salzmenge mit guter Annäherung geschätzt werden.

---

*) Es ist fraglich, ob dieser Unterschied den Fehlern der Bestimmungsmethode des SCN-Ions allein zuzuschreiben ist. Möglicherweise liegen hier infolge von Bildung mehrfacher komplexer Salze mit dem Eiweiß in der hochkonzentrierten Salzlösung Momente vor, welche der Löslichkeitserniedrigung stärker als bei anderen Salzen (siehe unten) entgegenwirken. In diesem Sinne ließen sich verwerten: die von Pauli und Handowsky gefundenen Eigentümlichkeiten der Hitzekoagulation von Eiweiß bei Gegenwart von Rhodaniden in höherer Konzentration, die von Pauli seinerzeit gefundene Wiederlösung von Salzeiweißfällungen insbesondere durch Rhodanide, noch unveröffentlichte Untersuchungen von Pauli und Brüll über die Beeinflussung der Alkoholfällung von Eiweiß durch Rhodanide und nicht zuletzt die von Abegg und Bodländer aufgestellte Beziehung zwischen Elektroaffinität und Komplexbildung, welche eine ganz besondere Neigung zur Komplexbildung für das schwache Rhodanion vorhersehen läßt.

[1]) Pauli, Pflügers Archiv 78, 315, 1899.

[2]) Hardy, Journ. of Physiol. 33, 1905.

[3]) Pauli, Kolloidzeitschr. Juli 1908. Selbständig bei Th. Steinkopff, Dresden 1908. — Pauli und Handowsky l. c.

Eine Salzlösung von mehreren $^{n}/_{100}$- bis $^{n}/_{10}$-Gehalt wird in 2%, Eiweiß um höchstens einige $^{n}/_{10000}$ bis $^{n}/_{1000}$ in ihrem freien Salzgehalt verringert. Unter der durch die Beobachtungen gestützten Voraussetzung, daß durch eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration in der Regel (siehe Fußnote *) die ans Eiweiß gebundene Salzmenge nicht erheblich vermehrt wird, würde sich für 5 bis 8fach normale Salzlösungen eine Löslichkeitszunahme um etwa 0,02% infolge Herstellung der Salzeiweißverbindung berechnen. Dagegen wird durch die Substitution von Lösungswasser die Löslichkeit beim Serum um 2 bis 3%, bei der Gelatine um 3 bis 5% herabgesetzt. In diesen Fällen wird also die durch Salzeiweißkomplexbildung hervorgerufene Löslichkeitssteigerung neben der durch Verminderung des verfügbaren Lösungsmittels bewirkten Löslichkeitsherabsetzung fast ganz verschwinden.

Umgekehrt liegen die Dinge bei den schwer löslichen Salzen, über welche die folgende Tabelle orientiert.

Tabelle XIV.

1 Substanz m-Äquivalentgewicht	Löslichkeit bei 25° C in			5 Normalität der gesättigten wässerigen Lösung	6	7
	2 Wasser l_w	3 Serum l_s	4 Gelatine 1,5% l_g		$\frac{l_s - l_w}{l_w} \cdot 100$ %	$\frac{l_s - l_w}{m} \cdot 10$
$CaSO_4$ m = 68	0,223	0,226	0,295	0,0328	1,3453	0,00045
$Ca_3(PO_4)_2$ m = 51,66	0,011	0,021	0,018	0,00213	90,909	0,00103
$CaCO_3$ m = 50	0,004	0,023	0,015	0,0008	475,0	0,0038
Kieselsäure	0,023	0,030	0,027	—	30,43	—
Harnsäure	0,040	0,057	—	0,00238	42,5	—

Bei den schwerlöslichen Elektrolyten sind die Verhältnisse leichter zu übersehen, weil der Wassergehalt der Salze nicht in Betracht kommt und weil die kleinen absoluten Werte von Salz pro 100 g Lösung neben der Masse des Lösungsmittels ganz verschwinden, so daß praktisch bei allen Salzen dieselbe Menge Eiweiß und Wasser in Reaktion tritt.

Betrachtet man zunächst die Calciumsalze, so ergibt sich hier ein Ansteigen der prozentigen Löslichkeitssteigerung durch Eiweiß mit abnehmender Wasserlöslichkeit derselben. Für die Reihe Sulfat, Phosphat, Carbonat wächst für unser Serum der relative Löslichkeitsanstieg wie 1:70:365 und für 1,5% Gelatine wie 1:2:8,5. Die Normalität der gesättigten wässerigen Lösung nimmt für die gleiche Salzreihe in der Proportion 41:2,6:1 ab. In unserem Serum steigt also die Löslichkeitserhöhung in stärkerem Maße als die Salzlöslichkeit in Wasser abnimmt. Bei der Gelatine ist dies nicht der Fall. Doch fehlt hier, abgesehen vom unterschiedlichen Eiweißgehalt, infolge des relativ hohen Aschewertes der Gelatine die Vergleichbarkeit der Resultate in beiden Fällen.

Der Zusammenhang zwischen Löslichkeitserhöhung durch Eiweiß und geringer Wasserlöslichkeit der Elektrolyte findet in analoger Weise seine Erklärung, wie oben die umgekehrte Löslichkeitsbeeinflussung der leichtlöslichen Salze. Infolge der teilweisen Substitution von Lösungswasser durch Eiweiß hätten wir auch bei den schwerlöslichen Salzen eine etwa 2,5%ige Herabsetzung der Normalität der gesättigten wässerigen Lösung zu erwarten. Diese Herabsetzung berechnet sich für die Reihe Sulfat, Phosphat, Carbonat zu 0,00082 n, 0,000053 n und 0,00002 n. Ihr Betrag erreicht also mit abnehmender Löslichkeit verschwindend kleine Werte. Bei der Salzeiweißverbindung liegen die Umstände ganz verschieden. Hier wird, wie andere Untersuchungen (Pauli und Handowsky l. c.) lehrten, auch aus sehr niederen Salzkonzentrationen eine relativ große Salzmenge vom Eiweiß aufgenommen. Selbst in den dünnen Lösungen der schwer löslichen Salze bleibt also die Löslichkeitserhöhung durch Komplexbildung mit dem Eiweiß ausgiebig wirksam, während die durch Wassersubtitution bedingte Löslichkeitsherabsetzung einen sehr geringen Betrag erreicht. Nur beim besser löslichen Calciumsulfat wird die Löslichkeitserniedrigung durch die vom Eiweiß bewirkte Wassersubstitution einen erheblichen Einfluß auf den Grad der Löslichkeitsänderung üben. Vermehrt man die Werte der Reihe 7 (Tabelle XIV), welche die Löslichkeitserhöhung durch Serum in Normalkonzentrationen ausdrücken, um die voraussichtlich stattgehabte Löslichkeitserniedrigung von 2,5% der Konzentration der ge-

sättigten wässerigen Lösungen, so erhält man für Sulfat und Phosphat die Zahlen 0,00127 und 0,00108, welche relativ gut übereinstimmen. Für das Carbonat beträgt der entsprechende Wert 0,00382. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß dieser höhere Wert eine Folge der schwierigen Bestimmungsmethode ist, viel eher dürfte es sich beim Calciumcarbonat um das Mitwirken besonderer die Löslichkeit bei Gegenwart von Eiweißkörpern steigernder Momente handeln. Diese Annahme würde in den interessanten Beobachtungen M. Siegfrieds[1]) über die Entstehung von Carbaminaten beim Zusammenbringen von kohlensauren Erdalkalien mit Aminosäuren und Eiweißkörpern eine wertvolle Unterstützung finden.

Als ein weiterer lösungsbefördernder Faktor könnte die Bindung der hydrolytischen Dissoziationsprodukte der schwerlöslichen Salze an das Eiweiß in Betracht gezogen werden, vor allem beim Calciumcarbonat und -phosphat. Versuche am Institute über die Bedeutung der hydrolytischen Dissoziation bei der Bildung von Salzeiweißkomplexen sind noch nicht abgeschlossen.

Daß aber neben dem Löslichkeitsgrade der schwache Säurecharakter von schwerlöslichen Elektrolyten nicht allzu stark für die Löslichkeitsbeeinflussung durch Eiweißkörper ins Gewicht fallen muß, dafür sprechen die Versuche mit Kieselsäure und Harnsäure, deren relative Löslichkeitssteigerung in unserem Serum sich um 30 bis 40% bewegt, also nahezu dem Grade ihrer Wasserlöslichkeit entspricht.

Im allgemeinen ergibt somit die Theorie bis auf gewisse Anomalien, für welche auch aus anderweitigen Beobachtungen eine besondere Erklärung möglich ist, nicht allein eine Einsicht in die Ursachen der verschiedenartigen Löslichkeitsbeeinflussung leicht- und schwerlöslicher Elektrolyte durch Eiweißstoffe, sondern auch die Notwendigkeit des Bestehens der scheinbar qualitativen Differenz in diesen Fällen.

Diese Aufklärung ist jedoch weit davon entfernt, das biologische Interesse abzuschwächen, welches der „ausgleichenden" Rolle der Eiweißkörper für die Löslichkeit der verschiedenen Elektrolyte zukommt.

---

[1]) M. Siegfried, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 85; 46, 401; 54, 423, 437; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39.

Wiewohl eine quantitative Übertragung unserer Serumversuche auf die Vorgänge im Organismus dadurch beeinträchtigt wird, daß im letzteren stets eine Mischung verschiedener leicht- und schwerlöslicher Elektrolyte gleichzeitig mit dem Eiweiß reagiert, so muß auf der anderen Seite die höhere Eiweißkonzentration der tierischen Säfte und Gewebe, welche das fünf- und mehrfache der in unseren Versuchen verwendeten beträgt, die im Organismus ausgeübten Löslichkeitswirkungen der Proteinsubstanzen vergrößern.

Jene Auffassung, welche für die Lösung und Abscheidung schwerlöslicher Elektrolyte den Eiweißstoffen eine entscheidende Rolle zumißt, scheint uns nun sehr geeignet, zu neuen Fragestellungen und experimentellen Prüfungen auf dem Gebiete der physiologischen und pathologischen Ablagerungen anzuregen. Diese Verhältnisse sollen jedoch hier nur gestreift werden, zumal unsere fortlaufenden Versuche Anlaß geben werden, darauf zurückzukommen.

Es dürften hier in erster Linie zwei fundamentale Prozesse in Betracht zu ziehen sein: 1. Die Eindickung von tierischem Gewebe, 2. der Abbau der Proteinstoffe in solchem wasserverarmten Körpermaterial. Für das physiologische und pathologische Vorkommen von Eindickungsvorgängen finden sich gewisse Anhaltspunkte, so in der hochgradigen Wasserarmut mancher Gewebe vor allem der Knochen, in dem mit dem Alter zunehmenden Wasserverlust der meisten Gewebe, und in dem Vorkommen von zahlreichen „trockenen“ nekrobiotischen Prozessen.

Die Gewebseindickung wird selten bis zur Löslichkeitsgrenze der leichtlöslichen Elektrolyte führen, welche übrigens durch das entstehende Konzentrationsgefälle gegen die Gewebsflüssigkeit und Blutbahn trotz der behinderten Diffusion (K. Meyer, H. Bechhold und Ziegler) zum Teil[1]) fortgeschafft werden

---

[1]) Es verdient hier übrigens erwähnt zu werden, daß Knorpel das an Natrium reichste Gewebe des Körpers vorstellt und daß bei Tieren mit hohem NaCl-Gehalt des Blutes wie beim Haifisch dieses Salz einen Hauptbestandteil der Skelettasche bildet. Die Möglichkeit des Zusammenhanges dieser Tatsachen mit Gewebseindickung, ohne daß auf besondere chemische Affinitäten rekurriert werden muß, ist gewiß einer Erörterung wert.

können. Von diesen Salzen ist, wie aus den früheren Ausführungen ersichtlich, der weit überwiegende Anteil im Wasser und nur ein verschwindender Anteil im Proteinmaterial der Gewebe festgehalten. Bei schwerlöslichen Elektrolyten, deren größter Teil an Eiweiß gebunden in Lösung gehalten ist, wird die Gewebsentwässerung allein kaum zur Ausfällung führen. Die relative Löslichkeitserhöhung $\frac{l_s - l_w}{l_w}$ wird sogar mit steigendem Eiweißgehalt wachsen. Dazu kommt nach allen anderweitigen Erfahrungen und wohl auch nach unseren Versuchen (s. o.) die infolge der zunehmenden Viscositätssteigerung der eingedickten Gewebe erhöhte Neigung zur Löslichkeitsüberschreitung. In diesem Zustande würde nun eine Gewebsveränderung, die zur Entstehung von Stoffen mit fehlender oder geringer Fähigkeit einer Komplexbildung mit den schwerlöslichen Elektrolyten führt, eine Abscheidung der letzteren zur Folge haben. Diese Abscheidung wird den von Guthrie[1]) über Krystallisation von physikalischen Gemischen und von van t'Hoff in seinen berühmten Studien über die Bildung der Staßfurter Salzlager aus Meerwasser festgestellten Gesetzmäßigkeiten folgen. Denken wir uns etwa ein Serum von 10% auf 70% Eiweißgehalt eingedickt und dabei einen Teil von Kochsalz und der anderen leichtlöslichen Salze durch Diffusion fortgeschafft, so würde eine Art Gallerte resultieren, bei deren Abbau die schwerlöslichen Kalksalze ausfallen müßten, falls sie nicht von den Spaltungsprodukten der Eiweißstoffe in Lösung gehalten würden. Nach unseren Beobachtungen war die relative Löslichkeitserhöhung für Calciumcarbonat durch Serumeiweiß am höchsten (475%), dann folgte Calciumphosphat (90%). Infolge seiner weit geringeren Wasserlöslichkeit und bedeutenderen Übersättigung wäre also im obigen Falle von Serumeindickung und Abbau erst eine starke Carbonatabscheidung zu erwarten, dann der Niederschlag einer Mischung von Carbonat und Phosphat. Es würde also im gesamten Niederschlag das Carbonat in viel größerer Menge enthalten sein, als das Phosphat. Bekanntlich ist aber das Verhältnis von Calciumphosphat und Carbonat in der

[1]) Guthrie, Phil. Mag. (5) 17, 462, 1884.

Knochenerde der Säugetiere gerade umgekehrt. Nach Zalesky[1]) entfallen z. B. auf 1000 Teile Knochenerde des Menschen 838,9 $Ca_3P_2O_8$, während an CO_2 (neben etwas Cl und F) 76,5 Calcium gebunden sind, und nach Carnot[2]) enthält die Femurasche des Menschen in 1000 Teilen 874,5 Calciumphosphat auf 101,8 Calciumcarbonat. Dieses Verhältnis von Phosphat zu Carbonat im Knochen bildete stets einen schwierigen Punkt in den Verkalkungstheorien, da alle Umstände für die Zufuhr der Ionen durch das Blut und gegen deren lokale Bildung in nennenswerter Menge sprachen. Unter diesen Verhältnissen war das Studium der Löslichkeitsbeeinflussung der verschiedenen Calciumsalze durch abgebautes Eiweiß von besonderem Interesse. Schon die Versuche mit einem infolge seines hohen Aschegehaltes weniger geeigneten Material[3]) — Pepton Witte — ergaben hier einen wichtigen Hinweis. Die zu prüfenden Stoffe wurden mit einer 2%igen Lösung von Wittepepton, wie einleitend geschildert, im Thermostaten geschüttelt und der Salzgehalt durch Veraschen und Glühen bestimmt. Die Peptonlösung selbst ergab für 100 g Lösung einen Aschenwert von 0,044 g, also nahe dem unserer 1,5%igen Gelatine.

Tabelle XV.

100 g 2%ige Peptonlösung enthalten Gramm:

	NH_4Cl	$CaSO_4$	$Ca_3(PO_4)_2$	$CaCO_3$	Kieselsäure
	27,97	0,203	0,007	0,008	0,012
	27,93	0,220	0,007	0,007	0,007
		0,196	0,008	0,011	0,007
		0,195	0,007	0,007	0,008
Mittel	27,95	0,203	0,007	0,008	0,008
Vergleichswerte in wässeriger Lösung . .	28,49	0,223	0,011	0,004	0,023

[1]) Zalesky, Hoppe-Seyler, Med. chem. Untersuch., S. 19, zit. nach Hammarsten, Physiol. Chemie 1907, 437.

[2]) Carnot, Compt. rend. 114.

[3]) Versuche unter viel günstigeren Bedingungen sind im Gange und sollen einer weiteren Mitteilung vorbehalten sein.

Aus den Versuchen läßt sich mit der einstweilen infolge ihrer Beschränktheit nötigen Reserve entnehmen, daß die im Wittepepton enthaltenen Eiweißabbaustoffe von den drei Calciumsalzen nur das Carbonat in Lösung zu halten vermögen, während für Phosphat und Sulfat sogar eine Löslichkeitsverminderung resultieren würde. Die Sonderstellung des Carbonates hat nach den schon erwähnten Untersuchungen M. Siegfrieds nichts Befremdendes. Diesem Autor gelang es, Erdalkalicarbonate nicht nur mit Serum, sondern auch mit Pepton und einfachen Aminosäuren in Carbaminate umzusetzen. Hier ist also die Komplexbildung bis zu den niedrigsten Eiweißspaltprodukten direkt erwiesen.

Nach diesen Beobachtungen ist es in hohem Grade wahrscheinlich, daß beim Gewebsabbau Calciumcarbonat zum Unterschiede vom Phosphat weiter in Lösung gehalten wird und sich so verhält, als ob es eine bedeutend höhere Löslichkeit hätte als dieses. Es würde somit erst nach Abscheidung großer Mengen von reinem oder überwiegendem Phosphat ausfallen können.

Von einem tieferen Einblick in die quantitativen Verhältnisse der abgeschiedenen Salzmischungen und möglichen Komplexsalze auch nur bei dem einfachen Falle, daß Serum eingedickt und abgebaut würde, sind wir allerdings noch weit entfernt. Die hier vorgebrachten Anschauungen können deshalb nur den Anspruch erheben, als Richtungslinien für den weiteren Gang unserer eigenen Arbeiten zu dienen. Sie berühren sich in einigen wichtigen Punkten mit einer Hypothese, welche Meinhard Pfaundler[1]) auf Grund einer vorzüglichen, kritischen Durcharbeitung des gesamten vorliegenden Materiales zur Frage der Gewebsverkalkung aufgestellt hat.

Pfaundler konkludiert: „Ein — anscheinend von den Knochen- (und Knorpel-)Zellen in einem gewissen vorgeschrittenen Stadium ihrer Entwickelung ausgehender — formativer Reiz verursacht eine fortschreitende Umwandlung eines Bestandteiles

[1]) Meinhard Pfaundler, Jahrb. f. Kinderheilk. N. F. 60, 123, 1904. Daselbst die nötigen Literaturangaben. Vgl. auch die neueste Zusammenstellung von H. Aron über die Chemie der Stützgewebe im Handbuch der Biochemie.

des umgebenden Gewebes, wodurch dieses eine spezifische (und zwar ursprünglich wohl mechanische) Affinität zu Kalksalzen des Blutes bzw. der Gewebsflüssigkeit gewinnt. Die derart zum ‚Kalksalzfänger' umgewandelte Masse wird zunächst von gelösten Kalksalzmassen durchdrungen, die mit der organischen Grundlage in Verbindung treten und bei deren Abbau präcipitieren."

In der Auffassung des Gewebszerfalles als Ursache der Übersättigung und Ausfällung von Kalksalzen bei der Verkalkung im Inneren von Geweben stimmen unsere[1]) und Pfaundlers Ansichten im wesentlichen überein.

Ein Unterschied zwischen Pfaundlers und unserer Anschauung liegt darin, daß Pfaundler durch eine Art autolytischer Spaltung im osteoiden Gewebe zunächst eine Substanz von spezifischer Kalksalzaffinität entstehen läßt, deren Abbau zur Ausfällung führt. Die eigenartige Zusammensetzung der Knochenerde bleibt dabei ohne besondere Annahmen unerklärt.

Nach unserer Auffassung käme der Gewebseindickung in irgend einer Form für die Kalksalzanreicherung Bedeutung zu. Eine solche Kalksalzanhäufung würde keine spezifische Gewebsmetamorphose erfordern und eine einheitlichere Betrachtung der verschiedenen Arten physiologischer und pathologischer Verkalkungsprozesse[2]) gestatten. Das Verhältnis der Aschenbestandteile der Knochenerde, die weitgehende Konstanz dieses Verhältnisses bei den verschiedenen Wirbeltieren, die anscheinende Identität im physikalisch-chemischen Anteil des Verkalkungsvorganges in physiologischen und pathologischen Fällen, das beträchtliche Eingehen des NaCl in die Skelettasche gewisser Seefische und manche andere Tatsachen würden dabei ihre Besonderheit verlieren.

---

[1]) Eine allgemeine Darlegung der Bedeutung der Biokolloide für die Löslichkeit und Abscheidung von schwerlöslichen Elektrolyten findet sich bei W. Pauli, Wandlungen in der Pathologie durch die Fortschritte der allgemeinen Chemie. Wien 1905.

[2]) Die Bildung äußerer fast reiner Calciumcarbonatskelette bedarf einer besonderen Betrachtung, die wir uns für spätere Mitteilungen vorbehalten.

Der hier betretene Weg, allen diesen Fragen näher zu kommen, scheint uns aussichtsvoll, und es dürfte unabweisbar sein, auch in anderen Fällen von Abscheidungen schwerlöslicher Stoffe im Organismus, wie bei der Bildung der Pflanzenskelette, bei den uratischen Ablagerungen und bei der Wiederauflösung solcher Niederschläge die Löslichkeitsbeeinflussung der schwerlöslichen Elektrolyte und der Salze überhaupt durch die Biokolloide viel mehr, als es bisher geschehen ist, zu berücksichtigen und experimentell durchzuarbeiten.

Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen.

2. Mitteilung.

Von

L. Rosenthaler.

(Mitteilung aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Straßburg i. Els.)

(Eingegangen am 24. März 1909.)

Die durch Emulsin hervorgebrachte Beeinflussung der Reaktion $C_6H_5CHO + HCN \rightleftarrows C_6H_5CH{<}^{OH}_{CN}$ erstreckt sich, wie ich in der ersten Mitteilung über die durch Enzyme bewirkten asymmetrischen Synthesen gezeigt habe,[1]) nach mehreren Richtungen:

1. Das Nitril wird optisch aktiv.
2. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird beschleunigt.
3. Das Gleichgewicht der Reaktion scheint nach der Nitrilseite verschoben zu werden.

Ich habe meine Versuche auf diesem Gebiete fortgesetzt und berichte im nachstehenden:

I. Über die Einwirkung von Fremdkörpern auf die Reaktion Benzaldehyd-Blausäure-Emulsin.

II. Über die Einwirkung des Emulsins auf die Blausäure-Addition mehrerer Aldehyde und Ketone.

I. Die Versuche über die Einwirkung von Fremdkörpern auf die Reaktion Benzaldehyd-Blausäure-Emulsin sollten u. a. darüber Aufschluß geben, ob sich Unterschiede in dem Verhalten von δ-[2]) und σ-Emulsin zeigen, und weiterhin darüber,

---

[1]) Diese Zeitschr. 14, 238, 1908.

[2]) Da der Buchstabe d schon anderweitig Verwendung findet, so ziehe ich es vor, für die Bezeichnung von $\delta\iota\acute{\alpha}$- und $\sigma\acute{\upsilon}\nu$-Emulsin die griechischen Lettern anzuwenden.

ob das σ-Emulsin in seinem Verhalten gegen Reagenzien Ähnlichkeiten mit den Eiweißstoffen aufweist. Zu den Versuchen diente ein Emulsin, von dem 0,5 g mit 0,675 g HCN und 5,3 g C_6H_5CHO ein Nitril von der Drehung $\alpha + = 3{,}7$ lieferten (Vergleichsreaktion). Dieser Vorversuch und ebenso die folgenden Versuche dieses Abschnittes wurden stets so ausgeführt, daß zur Lösung des Emulsins zunächst die Blausäure und die zu 100 ccm nötige Wassermenge und zuletzt erst der Benzaldehyd hinzugefügt wurde. Dann wurde $2^1/_2$ Stunden im Thermostaten bei 25° geschüttelt. Die Mengen von Blausäure, Benzaldehyd und Emulsin waren in allen Versuchen dieselben, ebenso das Gesamtvolum der Flüssigkeit. Der Zusatz von Fremdkörpern erfolgte vor dem des Benzaldehyds. Über weitere Einzelheiten gibt das Folgende Auskunft. Die Einwirkung der Fremdkörper auf das δ-Emulsin ist ausschließlich mit Hilfe von Amygdalin in lediglich qualitativen Versuchen so geprüft worden, daß die Lösung des Amygdalins in der Versuchsflüssigkeit nach 12 bis 24 Stunden mit der Rhodanreaktion auf das Vorhandensein von Blausäure untersucht wurde.

1. Weingeist. Kleine Mengen Weingeist (bis 10%) schaden verhältnismäßig wenig; auch sehr große Mengen heben die Wirkung des σ-Emulsins nicht auf, wenn die Flüssigkeit nicht filtriert wird. So wurde bei einem Alkoholgehalt der Flüssigkeit von 75% noch eine $\alpha +$ von 2 erzielt. Auch Amygdalin wird noch von einer Lösung von 0,5 g Emulsin in einem Gemisch von 25 g Wasser und 75 ccm Weingeist zersetzt.

Verfährt man aber so, daß man die 25 g Emulsinlösung mit nur 50 ccm Weingeist versetzt und dann filtriert, so erhält man mit Blausäure und Benzaldehyd kein optisch-aktives Nitril, auch dann nicht, wenn die Blausäure vor dem Weingeist hinzugefügt war.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn die Emulsinlösung mit gleichen Teilen Weingeist gefällt wird.

a) Die Lösung von 0,75 g Emulsin in 37,5 g Wasser wird mit 37,5 ccm Weingeist versetzt. 50 ccm Filtrat geben mit Blausäure und Benzaldehyd $\alpha + = 2{,}1$.

b) Die Lösung von 0,75 g Emulsin und 1,0125 g Blausäure in 37,5 ccm Wasser wird mit 37,5 ccm Weingeist versetzt; 50 ccm des Filtrates geben mit dem Benzaldehyd $\alpha + = 1{,}4$.

Auch bei öfterer Wiederholung dieser Versuche war das Resultat stets dasselbe. Wurde die Blausäure vor der Fällung mit Weingeist zugesetzt, so wurde eine geringere Drehung erhalten, als im entgegengesetzten Falle. Dies Ergebnis ist, wie ich glaube, nur so zu deuten, daß die Blausäure mit σ-Emulsin eine Verbindung eingeht, die in Weingeist weniger löslich ist, als das σ-Emulsin selbst. Damit ist eine weitere Stütze für die Annahme einer Zwischenverbindung von Emulsin und Blausäure gegeben, auf die bereits das Ergebnis früherer Versuche über die zur Erhaltung einer maximalen Aktivität einzuhaltenden Reihenfolge der Reagenzien hinwies.[1])

2. Chloroform, Essigäther, Petroläther, Xylol (je 25 ccm). Diese mit Wasser nicht mischbaren Flüssigkeiten wurden hauptsächlich deshalb herangezogen, weil eine Anzahl fester Aldehyde, die auf ihr Verhalten zur HCN-Emulsinreaktion geprüft werden sollten, in einer dieser Flüssigkeiten zu lösen waren; es mußte aber vorher festgestellt sein, ob sie nicht die Reaktion völlig verhindern, wenn dies auch von vornherein nicht wahrscheinlich war. Da über die spezifische Drehung nichts bekannt ist, die das Benzaldehydcyanhydrin in diesen Lösungsmitteln zeigt, so wurde das jedesmal erhaltene Nitril in Mandelsäure übergeführt und auch deren Drehung in wässeriger Lösung bestimmt. Weil jedoch die Verseifung des Nitrils auch bei möglichster Einhaltung gleichmäßiger Bedingungen kaum zu (optisch) völlig vergleichbaren Resultaten führt, so sehe ich von der Wiedergabe der Einzelresultate ab. Verhindert hat, wie zu erwarten war, keine der verwendeten Flüssigkeiten das Zustandekommen der optischen Aktivität, aber in allen Fällen wiesen die bei deren Verwendung erhaltenen Nitrile und Säuren eine geringere Drehung auf, als bei der Vergleichsreaktion erhalten wurde. Das Nitril und die Mandelsäure, die bei Anwendung von Essigäther erhalten wurden, drehten weit stärker als die mit den anderen Lösungsmitteln erhaltenen Reaktionsprodukte, deren Drehungen ebenfalls wieder Unterschiede untereinander zeigten. Die Ursache dieser Verschiedenheiten ist wohl kaum in spezifischen Einflüssen zu suchen, welche die erwähnten Flüssigkeiten auf die asymmetrische Synthese aus-

---

[1]) l. c. S. 250 u. 251.

üben. Die im Verhältnis zur Vergleichsreaktion niedrigeren Resultate sind zunächst durch die Verdünnung des Benzaldehyds bedingt. Und wenn die Resultate trotz der Anwendung gleicher Mengen der verschiedenen Flüssigkeiten untereinander abweichen, so ist dafür vielleicht die Art der Verteilung des Benzaldehyds zwischen Wasser und den versuchten Flüssigkeiten verantwortlich zu machen; der Verteilungsfaktor wird je nach dem angewandten Lösungsmittel verschieden sein. Eine experimentelle Untersuchung über diese Verhältnisse habe ich, als für meine weiteren Versuche nebensächlich, nicht angestellt.

3. H- und OH-Ionen.

a) 10 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure: $\alpha + = 1,9$

b) 10 ccm $^n/_{10}$-Kalilauge: $\alpha + = 0$

Die Reaktion wird also sowohl durch Säure als durch Lauge beeinflußt. Während aber die Säure nur schädigt, verhindert die Lauge das Entstehen optisch-aktiver Substanz vollständig, obwohl noch ein Überschuß von Blausäure vorhanden ist. Natürlich kann man anstatt Lauge zuzusetzen, von vornherein entsprechende Mengen von Cyankalium und Blausäure nehmen; am Endresultat wird dadurch selbstverständlich nichts geändert. Man hat hier also das anscheinend merkwürdige Ergebnis, daß eine Reaktion, zu deren Zustandekommen Blausäure notwendig ist, durch verhältnismäßig kleine Mengen von Cyankalium verhindert wird. Da aber eine derartige Lösung von Cyankalium und Blausäure infolge der starken hydrolytischen Dissoziation des ersteren alkalisch reagiert, so dürfte die Erklärung in einer Beeinflussung der Reaktion (Schädigung des Emulsins) durch OH-Ionen zu suchen sein.

4. Phenol. Bei Verwendung von 1 % Phenol ist die Beeinflussung nur gering; 5 % Phenol verhindert die Entstehung optisch-aktiver Substanz. Auch Amygdalin wird dann nicht mehr zersetzt.

5. Formaldehyd schädigt, trotzdem es noch mit dem Benzaldehyd um die Blausäure konkurriert, verhältnismäßig wenig. Bei Anwendung von 1 g Formaldehydlösung $\alpha + = 1,6$. Auch die Wirkung des δ-Emulsins wird in dieser Konzentration nicht aufgehoben.

6. Ammoniumsulfat. Wird eine Emulsinlösung völlig mit Ammonsulfat gesättigt, so erzeugt das Filtrat weder optisch-

aktives Nitril noch zersetzt es Amygdalin. Fügt man Ammonsulfat nur bis zur Halbsättigung hinzu, so verhält sich das Filtrat gegenüber der Benzaldehyd-Blausäure-Reaktion negativ, zerlegt aber noch Amygdalin. Der in Wasser gelöste Niederschlag wirkt aktivierend; er enthält also das σ-Emulsin; das Filtrat ist frei davon und enthält nur δ-Emulsin. Durch Ammonsulfat in $^1/_4$-Sättigung wird σ-Emulsin nicht gefällt.

7. Magnesiumsulfat. Sättigt man mit Magnesiumsulfat vollständig, so liegen die Verhältnisse ebenso wie bei der Halbsättigung mit Ammonsulfat: Das Filtrat ist frei von σ-Emulsin, zersetzt aber Amygdalin.

Durch Ammonsulfat und Magnesiumsulfat läßt sich somit das δ-Emulsin frei von σ-Emulsin erhalten. Auch das Umgekehrte scheint möglich, ist aber bisher von mir trotz wiederholtem Auflösen und Fällen bis jetzt noch nicht erreicht worden, da die Niederschläge immer noch Amygdalin zersetzten. Trotzdem zeigen die durch Fällung mit Magnesiumsulfat erhaltenen Präparate schon einen typischen Unterschied gegenüber den ungereinigten. Wenn letztere auf Benzaldehyd- und Blausäure wirken, so ist das Maximum der optischen Aktivität nach ungefähr $2^1/_2$ Stunden erreicht und nimmt von da an ab; bei den mit Magnesiumsulfat gefällten Präparaten ist sie nach 24 Stunden aber noch ebenso stark als nach $2^1/_2$ Stunden. Die erwähnte Abnahme der optischen Aktivität ist somit eine spezifische Wirkung des δ-Emulsins, die man sich als einen Zerfall des optisch-aktiven $C_6H_5CH<^{OH}_{CN}$ in C_6H_5CHO und HCN zu denken hat.

8. Schwefelwasserstoff schädigt das σ-Emulsin nicht.

9. Schwermetallsalze. Bei diesen Versuchen ist zwar zu berücksichtigen, daß die Schwermetalle sich mit HCN verbinden können. Doch war in allen Fällen die Menge der angewandten Metallsalze so gering, daß dieser Einfluß gegenüber dem spezifischen der Schwermetallsalz-Wirkung nicht in Betracht kommt, ganz abgesehen davon, daß ein Teil der Schwermetalle durch Emulsin niedergeschlagen wird.

a) Kupfersulfat. Wirkt bereits in einer Menge von 0,05 g schädigend. 0,2 g Kupfersulfat fällen das in 0,5 g Emulsin enthaltene σ-Emulsin vollständig; das Filtrat liefert kein aktives Nitril, zersetzt aber noch Amygdalin. Auch hier schien sich

somit die Möglichkeit zu bieten, das σ-Emulsin frei von δ-Emulsin zu erhalten; doch ist es mir noch nicht gelungen, das σ-Emulsin aus dem Niederschlag zu isolieren.

b) Bleiacetat. Der Einfluß des Bleiacetats ist ein viel geringerer als der des Kupfersulfats, auch bei Berücksichtigung der verschiedenen Größe ihrer Molekulargewichte. Fällt man eine Lösung von 0,5 g Emulsin mit 0,5 g Bleiacetat, so gibt das Filtrat, das auf weiteren Zusatz von Bleiacetat keinen Niederschlag mehr gibt, noch ein $\alpha + = 1$. Wenn somit Bleiacetat auch von schädlichem Einfluß auf die Reaktion ist, so muß dies doch nicht notwendigerweise auf einer spezifischen Wirkung beruhen, da das σ-Emulsin von dem entstehenden Niederschlag hier, wie in anderen Fällen, mechanisch niedergerissen werden könnte. Das Filtrat vom Bleiniederschlag zersetzt noch Amygdalin.

c) Mangansulfat (in einer Menge von 0,5 g) verhindert weder die aktivierende noch die hydrolysierende Wirkung des Emulsins.

d) Quecksilberchlorid. Das nach Einwirkung von 0,2 g Sublimat erhaltene Filtrat ist auf Benzaldehyd-Blausäure und Amygdalin ohne Wirkung.

10. Ferrocyanwasserstoff (Ferrocyankalium und Essigsäure) fällt weder σ- noch δ-Emulsin.

11. Pepsin und Trypsin schädigen in neutraler Lösung in 24stündiger Einwirkung bei 35^0 das σ-Emulsin. Anwendung von Säure bei Pepsin, von Alkali bei Trypsin wurde nicht versucht, da H- und OH-Ionen schon für sich allein das σ-Emulsin allmählich zerstören.

σ-Emulsin wird weiterhin durch Pikrinsäure und Gerbsäure gefällt und dialysiert nur äußerst langsam. Aus einer Lösung von 2 g Emulsin in 20 ccm Wasser war in die Außenschicht von 50 ccm Wasser nach 6 Tagen nur so viel dialysiert, daß mit 0,675 g Blausäure und 10,6 g Benzaldehyd ein $\alpha + = 0,1$ entstand.

Im großen ganzen verhält sich also σ-Emulsin wie ein Eiweißkörper, womit ich aber nicht die Behauptung aufstellen will, daß es in der Tat ein Eiweißkörper ist. Von den Albuminsubstanzen unterscheidet es sich jedenfalls dadurch, daß es durch Ferrocyanwasserstoff nicht gefällt wird.

II. Während alle vorhergehenden Versuche mit Benzaldehyd vorgenommen wurden, habe ich noch Versuche mit einer Anzahl anderer Aldehyde und auch einigen Ketonen ausgeführt. Diese Versuche sollten dreierlei aufklären:

a) Vermag Emulsin allgemein die Blausäure-Addition der Aldehyde und geeigneter Ketone asymmetrisch zu gestalten?

b) Wirkt Emulsin allgemein beschleunigend auf die Geschwindigkeit der Blausäure-Addition?

c) Kann Emulsin das Gleichgewicht dieser Reaktionen beeinflussen?

a) Nachfolgende Tabelle gibt die Aldehyde[1]) und Ketone an, die ich der Einwirkung von Emulsin und Blausäure ausgesetzt habe, nebst der Art der Nitrile und Säuren, die dadurch entstanden. d und l bedeuten dabei, wie üblich, rechts- und linksdrehende Körper, i bedeutet, daß eine Drehung nicht beobachtet werden konnte. Die Versuche wurden, gemäß den beim Benzaldehyd gemachten Erfahrungen so ausgeführt, daß zu einer Lösung von 5 g Emulsin und 0,675 g Blausäure der addierende Körper in (auf die Blausäure bezogen) mehr als doppelt äquimolekularer Menge hinzugefügt wurde, und zwar in kleinen Anteilen unter ständigem Schütteln, so, daß dieser Teil der Operation eine Stunde in Anspruch nahm. Dann wurde noch mit der Schüttelmaschine $1^1/_2$ Stunden im Thermostaten bei 25° geschüttelt und zuletzt (in der Regel) mit Chloroform, seltener mit Essigäther ausgezogen. Feste wasserunlösliche Substanzen wurden in Chloroform oder Essigäther gelöst zur Reaktion verwendet.

Die Verseifung der Nitrile wurde je nach der Art der Substanzen teils mit rauchender, teils mit schwächerer Salzsäure in der Regel auf dem Dampfbade, manchmal bei niederer Temperatur vorgenommen. Doch ist es mir, wie die Fragezeichen der Tabelle zeigen, nicht in allen Fällen geglückt, aus den optisch-aktiven Nitrilen auch aktive Säuren zu erhalten.

---

[1]) Für Überlassung einiger nicht käuflicher Aldehyde bin ich den Herren Prof. Dr. Thiele, Straßburg, und Schimmel & Co., Leipzig, sehr zu Dank verpflichtet.

Tabelle I.

Aldehyd oder Keton	Nitril	Säure	Aldehyd oder Keton	Nitril	Säure
Acetaldehyd	d	?	Piperonal	d	?
Chloral	i	i	o-Nitrobenzaldehyd	d	l
Isobutyraldehyd	d	?	m-Nitrobenzaldehyd	d	l
Heptylaldehyd	d	?	p-Nitrobenzaldehyd	i	i
Oktylaldehyd	d	?	Zimtaldehyd	d	l
Citral	l	?	Phenylacetaldehyd	d	d
Furfurol	d	?	Protokatechualdehyd	i	i
Salicylaldehyd	i	i	o-Phthalaldehyd	l	?
m-Oxybenzaldehyd	i	i	Isophthalaldehyd	d	l
p-Oxybenzaldehyd	i	i	Terephthalaldehyd	d	l
o-Methoxybenzaldehyd	d	?	Methyläthylketon	i	i
Anisaldehyd	d	l	Hypnon	i	i
Kuminol	d	?			

Wie die Tabelle zeigt, liefern eine große Anzahl von Aldehyden, wenn auch nicht alle untersuchten, aktive Nitrile. Negativ verhielten sich vor allem Salicylaldehyd und seine Isomeren, sowie Protokatechualdehyd. Das Vorhandensein von Phenolgruppen scheint demgemäß hinderlich zu sein.[1]) Ist die Phenolgruppe besetzt, wie im Anisaldehyd, Methoxybenzaldehyd und Piperonal, so sind die Nitrile optisch-aktiv. Die überwiegende Mehrzahl der entstandenen optisch-aktiven Nitrile dreht nach rechts, insbesondere alle aromatischen Nitrile mit Ausnahme des aus o-Phthalaldehyd entstandenen.

Die beiden angeführten Ketone, je ein aliphatisches und ein aromatisches haben keine aktiven Nitrile gebildet. Auch die mit Fructose vorgenommenen Versuche sprechen nicht für die Entstehung eines anderen Nitrils, als dessen, das auch ohne Emulsin entsteht. Wegen des negativen Ausfalls dieser Versuche wurde die Untersuchung nicht auf andere Ketone ausgedehnt.

b) Die Versuche, welche die Frage beantworten sollten, ob Emulsin allgemein die Geschwindigkeit der Blausäure-Addition beschleunigt, wurden in derselben Weise wie die analogen Versuche mit Benzaldehyd[2]) ausgeführt. Nur wurden die Flüssig-

[1]) Vanillin, das ebenfalls herangezogen wurde, gab eine so schwache Rechtsdrehung, daß sie vielleicht auf eine Verunreinigung zurückzuführen ist.

[2]) l. c., 247.

keiten vor der Entnahme des zur Titration verwendeten Anteils auf 20° abgekühlt. Es wurden in den Emulsin-Versuchen je 0,5 g Emulsin, 1,35 g Blausäure, eine äquivalente Menge des addierenden Körpers und Wasser zu 100 ccm verwendet, in den Vergleichsversuchen dasselbe ohne Emulsin. Waren die verwendeten Körper in Wasser unlöslich, so wurde der Emulsinversuch und der Vergleichsversuch gleichzeitig und in gleicher Weise mit der Schüttelmaschine geschüttelt. Die nachfolgende Tabelle gibt die Mengen von Blausäure an, die nach einstündiger Dauer der bei 25° ausgeführten Versuche noch frei und gebunden waren.

Bei den Emulsinversuchen ist die Silbermenge in Abzug gebracht, die das Emulsin bei Gegenwart des addierenden Körpers allein verbraucht. Sie betrug in der Regel für 0,5 g Emulsin 4 ccm $^{n}/_{10}$-Silbernitrat, bei Anwesenheit von Furfurol nur 2 ccm.

Tabelle II.

Aldehyd oder Ketone	HCN frei	Mit Emulsin HCN gebunden		Ohne Emulsin		
				HCN	HCN gebunden	
		absolut	%	frei	absolut	%
Anisaldehyd . . .	0,5732	0,7768	57,54	1,1275	0,1225	9,07
Salicylaldehyd . . .	0,2144	1,1356	84,12	1,0238	0,3262	24,16
Zimtaldehyd . . .	0,7873	0,5627	41,68	1,1131	0,2369	17,55
Furfurol	0,3121	1,0379	76,88	1,2074	0,1426	10,56
Chloral	0,2009	1,1491	85,12	0,5702	0,7798	57,76
Formaldehyd . . .	0,4698	0,8802	65,20	0,8380	0,5120	37,92
Glykose	1,1232	0,2268	16,80	1,2981	0,0519	3,84
Methyläthylketon .	0,3369	1,0131	75,04	1,0562	0,2938	21,7
Aceton	0,4212	0,9288	68,80	1,1664	0,1836	13,6
Acetophenon . . .	0,9850[1])	0,3650	27,03	1,1837	0,1663	12,32

Die Tabelle zeigt, daß unter der Einwirkung des Emulsins durchweg eine Beschleunigung der Blausäure-Addition eintritt, die bei einzelnen Aldehyden, wie Anisaldehyd, Furfurol, Glykose, eine sehr bedeutende ist. Die Versuche mit Furfurol und Glykose u. a. wasserlöslichen Körpern zeigen gleichzeitig, daß die Beschleunigung nicht auf mechanische Ursachen, wie bessere Verteilung durch Emulgierung, zurückzuführen ist, was bei den

[1]) Bei Verwendung von 1 g Emulsin.

wasserunlöslichen Körpern, wie Salicylaldehyd und Anisaldehyd, von vornherein nicht ausgeschlossen war. Die Beschleunigung erstreckt sich zum Unterschied von der aktivierenden Wirkung auch auf die Ketone. Nur beim Acetophenon brachte die Verwendung von 0,5 g Emulsin noch keine Beschleunigung, wohl aber eine solche von 1 g, mit welcher Menge die in der Tabelle wiedergegebenen Daten erzielt sind. Auch bei Aldehyden, die keine optisch-aktiven Nitrile liefern, wie das Chloral, oder gar nicht liefern können, wie der Formaldehyd, wird die Blausäure-Addition beschleunigt. Die Beschleunigung der Blausäure-Addition durch Emulsin kann also unabhängig von der Entstehung optisch-aktiver Körper vor sich gehen.

c) Die bei der Synthese des Benzaldehydcyanhydrins festgestellte Erscheinung, daß das Gleichgewicht der Reaktion durch das Emulsin nach der Nitrilseite hin verschoben wird, forderte zu Versuchen darüber auf, ob diese Tatsache allgemein für Aldehyde und Ketone zutrifft. Bei der Ausführung dieser Versuche bin ich auf einige Schwierigkeiten gestoßen, die mich von einer detaillierten Angabe meiner Versuchsergebnisse vorläufig absehen lassen. So traten z. B. bei den Versuchen mit Salicylaldehyd und Emulsin zweifellos Zersetzungen ein, die zu stark orange gefärbten Körpern führten. In andern Emulsin-Versuchen schien die Menge der freien Blausäure nach Erreichung eines Minimums wieder zuzunehmen. Auch das ist zu berücksichtigen, daß durch die zur Titration erforderlichen Wegnahme der freien Blausäure eine, wenn auch nur langsam verlaufende Verschiebung des Gleichgewichts eintreten wird. Immerhin sind die in einigen Fällen festgestellten Unterschiede zwischen den mit und ohne Emulsin erzielten Ergebnissen groß genug, um für diese Fälle eine durch das Emulsin eintretende Verschiebung des Gleichgewichts annehmen zu dürfen. Beim Anisaldehyd sind z. B. nach Erreichung des Gleichgewichts gebunden: ohne Emulsin 33,5 % HCN, mit Emulsin 73,50 %; beim Zimtaldehyd: ohne Emulsin 39,85 %, mit Emulsin 71,88 %.

Die bei diesen Versuchen auftretenden Schwierigkeiten sind zum Teil dadurch veranlaßt, daß, wie nachgewiesen, das käufliche Emulsin sowohl das die Synthese beeinflussende σ-Emulsin, als das spaltende δ-Emulsin enthält. Ich hoffe, diese Ver-

suche ebenso wie den noch vorzunehmenden physikalisch-chemischen Teil der Untersuchung mit einem Emulsin aufnehmen zu können, das möglichst frei von δ-Emulsin ist.

Zum Schlusse seien die Möglichkeiten diskutiert, die bei der Emulsin-Blausäure-Reaktion für die Entstehung optisch-aktiver Körper in Betracht kommen.

1. Aldehyd und Blausäure vereinigen sich zunächst zu inaktivem Nitril, das dann durch Emulsin ähnlich gespalten wird, wie die inaktiven Ester der Mandelsäure bei den bekannten Versuchen Dakins durch Lipase. Beim Benzaldehydcyanhydrin müßte dann das l-Nitril rascher zerlegt werden als das d-Nitril; die Flüssigkeit würde dadurch vorübergehend rechtsdrehend, um schließlich wieder inaktiv zu werden. Für diese Möglichkeit spricht die bereits früher erwähnte Tatsache, daß die optische Aktivität unter dem Einfluß des Emulsins wieder abnimmt. Gegen diese Möglichkeit spricht folgendes:

a) Da, wie ich experimentell festgestellt habe, nach 24-stündiger, bei 30° erfolgender Einwirkung des Emulsins auf äquivalente Mengen von Benzaldehyd und Blausäure noch sämtliche Blausäure vorhanden ist, so kann die oben angenommene Spaltung nur so erfolgen, daß das Nitril wieder in Aldehyd und Blausäure zerfällt. Dann steht es aber mit der gemachten Annahme nicht im Einklang, daß bei den Emulsinversuchen sowohl nach einer Stunde als nach Erreichung des Gleichgewichts mehr Blausäure gebunden ist als in den Versuchen ohne Emulsin.

b) Ein die äquimolekulare Menge übersteigender Zusatz des Aldehyds müßte zu einer Zurückdrängung der Dissoziation und damit zu einer verminderten Bildung von optisch-aktiver Substanz führen. Tatsache ist das Gegenteil.

c) Wenn man zu Benzaldehydcyanhydrin, etwa einem im Gleichgewicht befindlichen Gemisch von Benzaldehyd und Blausäure Emulsin hinzufügt, so müßte unter obiger Annahme in der Zeit, in der das Maximum der optischen Aktivität erreicht wird, zum mindesten ebensoviel optisch-aktive Substanz gebildet werden, als wenn man Emulsin, Benzaldehyd und Blausäure erst bei Beginn des Versuchs zusammenmischt. Auch hier trifft, wie ich schon früher gezeigt habe, das Gegenteil zu.

2. Optisch-aktive Körper könnten auch entstehen, wenn das zunächst gebildete inaktive Nitril durch einen Vorgang der Art zersetzt würde, wie er in Pasteurs biologischer Methode zur Anwendung gelangt. In diesem Falle müßte eigentlich, was nicht der Fall ist, ein bleibendes Maximum der optischen Aktivität erreicht werden. Gegen eine derartige Pasteursche Zersetzung sprechen aber vor allem die unter 1. a) angeführten Gründe.

3. Eine Erklärung für alle die optische Aktivität betreffenden Erscheinungen, über die ich in dieser und der vorhergehenden Mitteilung berichtet habe, bietet sich in dem Zusammenwirken eines die asymmetrische Synthese herbeiführenden σ-Emulsins und eines die optisch-aktiven Nitrile spaltenden δ-Emulsins.

Für die Existenz des letzteren sei noch folgender Versuch angeführt: Die Lösung von 1 g Emulsin wurde mit Magnesiumsulfat gefällt und der Niederschlag, der nach dem oben Mitgeteilten hauptsächlich σ-Emulsin enthält, mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung ausgewaschen, so daß Waschwasser und Filtrat zusammen 50 ccm betrugen, der den Hauptanteil des δ-Emulsins enthalten mußte. Auch der Niederschlag wurde zu 50 ccm gelöst, und beide Flüssigkeiten mit je 25 ccm einer Lösung von Benzaldehydcyanhydrin in Chloroform, deren Drehung + 1,85 betrug, bei 25° in gleicher Weise 21 Stunden lang geschüttelt. Nach dieser Zeit zeigte das Nitril, das mit der Lösung des Rückstandes behandelt war, noch eine Drehung von $\alpha + = 1{,}24$, das andere aber nur noch von 0,74.

4. Eine vierte mögliche Annahme ist die, daß neben einem nach 1. lipaseähnlich wirkenden oder nach 2. sich verhaltenden Enzym ein zweites zugegen ist, das, ohne die optische Aktivität zu beeinflussen, lediglich die Addition der Blausäure beschleunigt und das Gleichgewicht verschiebt. In diesem Falle würden von den unter 1. und 2. genannten Gegengründen im wesentlichen nur noch 1. c) geltend zu machen sein. Daneben wäre vielleicht noch anzuführen, daß dann das nitrilspaltende Enzym, das doch höchstwahrscheinlich mit dem amygdalinspaltenden identisch sein müßte, in dem unter 3. angeführten Versuch eine Vermehrung der optischen Aktivität herbeiführen müßte, während, wie gezeigt, das Gegenteil richtig ist.

Eine Erörterung der Möglichkeit, daß die Wirkungen, die ich einem σ- und δ-Emulsin zuschreibe, von einem einzigen Enzym herrühren, das sowohl synthetisiert als spaltet, halte ich nach dem bisher Festgestellten nicht für geboten. Ob das die Beschleunigung der Blausäure-Addition bewirkende Agens ein drittes und also von σ- und δ-Emulsin unabhängiges Enzym darstellt, ist noch zu untersuchen.

Berichtigung.

In der ersten Mitteilung[1]) von L. Rosenthaler über „Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthesen" hat sich bei der Wiedergabe der Literatur infolge eines redaktionellen Mißverständnisses ein Irrtum eingeschlichen. Der Absatz von Zeile 22 bis Zeile 27 auf S. 240 ist zu streichen. Die dort erwähnte Diskussion über die Spaltung von β-Methyl-i-glucosid durch Emulsin betrifft die Frage der asymmetrischen Spaltung und hat mit W. Marckwalds bekannter asymmetrischen Synthese nichts zu tun.

1) Diese Zeitschr. 14, 238, 1908.

Chemische Umwandlungen durch Strahlenarten.

2. Mitteilung.

Wirkungen des elektrischen Gleichstromes.[1])

Von

Carl Neuberg.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Mit 1 Figur im Text.

Im Herbste vorigen Jahres habe ich in einer ersten Mitteilung über Strahlenwirkungen[2]) von chemischen Veränderungen berichtet, die unter dem Einflusse der durch Katalysatoren übertragenen Lichtenergie zustande kommen. Die weiter auf diesem Gebiete, z. T. mit künstlichen Lichtquellen erzielten Resultate sollen noch durch Versuche ergänzt werden, zu denen die gleichmäßige Sommersonne erforderlich ist.

Inzwischen habe ich das Studium der Wirkung elektrischer Wellen in ähnlicher Weise in Angriff genommen. Abgesehen von der therapeutischen Verwendung der verschiedenen Formen des elektrischen Stromes und den erfolgreichen Versuchen, ihn der praktischen Agrikultur nutzbar zu machen, kommt der Elektrizität vielleicht eine natürliche biologisch-chemische Bedeutung zu, da Potentialdifferenzen zwischen den verschiedenen Teilen des pflanzlichen und tierischen Organismus ja sicher festgestellt sind.

---

[1]) Vorgetragen in der Sitzung der Gesellschaft der Charitéärzte, Februar 1909.

[2]) C. Neuberg, Chem. Umwandlungen durch Strahlenarten. I. Katalytische Reaktion des Sonnenlichtes. Diese Zeitschr. 13, 305, 1908.

Zunächst sei über Versuche mit Gleichstrom berichtet, die sich an meine früher ausgeführten Elektrolysen von Kohlenhydratderivaten und Aminosäuren[1]) anschließen.

Bekanntlich liegt bereits ein großes Material über das Verhalten einfach gebauter chemischer Substanzen gegen den elektrischen Strom vor. Aber die Mehrzahl dieser Untersuchungen erstreckt sich teils nur auf einzelne Grundtypen, teils sind sie unter solch extremen Bedingungen (z. B. mit Lösungen in konzentrierten Mineralsäuren oder Laugen, bei Gegenwart organischer Solvenzien usw.) angestellt, daß eine Verwertung dieser Ergebnisse für biologische Fragen nicht in Betracht kommt. Über die Einwirkung des elektrischen Stromes auf komplizierter gebaute Verbindungen, wie wir sie in den lebenden Organismen antreffen, ist so gut wie nichts bekannt.

Im folgenden sei zunächst eine tabellarische Übersicht über die durch den elektrischen Gleichstrom in den geprüften Fällen hervorgebrachten Veränderungen gegeben.

Die Versuche sind in Anlehnung an die natürlichen Verhältnisse so einfach wie möglich angeordnet; sie wurden, um komplizierte Umsetzungen mit dem Lösungsmittel zu vermeiden, mit rein wässerigen Flüssigkeiten vorgenommen. In der Regel kam eine Konzentration von 1 bis 5% zur Anwendung. Benutzt wurde der gleichgerichtete Straßenstrom von 220 Volt, der durch eine eingeschaltete 16 kerzige Glühlampe geschwächt war. (Wegen des im Verlaufe der Elektrolyse wechselnden Widerstandes kann von genaueren Angaben über die Stromstärke abgesehen werden.) Der Strom wurde in die Flüssigkeit durch Platinelektroden geleitet, die sich horizontal oder vertikal in einer Entfernung von 1,6 cm gegenüberstanden. Die Oberfläche der beiden vertikal angebrachten Platinelektroden betrug je 28,52 qcm, die der horizontalen 31,5 qcm und 41,2 qcm.

Die Dauer der Elektrolysen wurde auf etwa 1 bis 72 Stunden bemessen, jedoch wurde häufig bereits nach 10 bis 20 Minuten auf den Eintritt der Reaktion geprüft.

Die Versuche sind sämtlich bei Zimmertemperatur angestellt und in den Fällen, wo es nötig war, durch äußere

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 7, 527, 1907.

Kühlung derart reguliert, daß die Temperatur 40° nicht überschritt.

Die Flüssigkeiten wurden in Gefäßen aus Hartglas[1]) der Einwirkung des Stromes ausgesetzt; von der Anwendung eines Diaphragmas ist zunächt absichtlich in Hinblick auf die natürlichen Bedingungen Abstand genommen. Die Elektrolyse geschah stets mit den Lösungen der Substanz in destilliertem Wasser ohne jeden fremden Zusatz.[2]) Vielmehr wurden die untersuchten Substanzen im Zustande möglichster Reinheit (nach mehrfachem Umkrystallisieren bzw. Umfällen usw.) benutzt. Auch bei den Verbindungen, die an sich überhaupt kein Leitungsvermögen oder ein minimales besitzen, wurde kein Elektrolyt hinzugefügt; denn es hat sich gezeigt, daß sich — bei den verschiedenen Körpern mit ungleicher Schnelligkeit — nach einiger Zeit unter der Stromwirkung Leitfähigkeit einstellt.

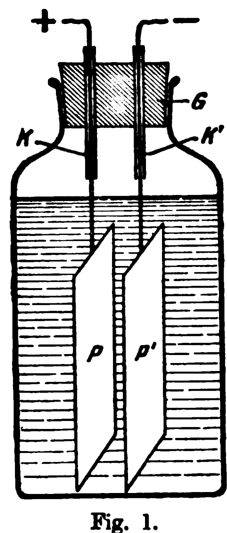


Fig. 1.

Von der Untersuchung der bei der Elektrolyse entweichenden Gase sowie in kleineren Mengen als Nebenprodukte auftretenden Säuren ist zunächst abgesehen, da diese für die vorliegende Frage von untergeordnetem Interesse sind.

Da, wie aus dem folgenden hervorgeht, öfter auf die Entstehung flüchtiger Produkte (Aldehyde) Rücksicht zu nehmen war, so fand ein Teil der Elektrolysen nach nebenstehendem Schema im geschlossenen Gefäß statt.

In dem Gummistopfen G stecken die Glascapillaren K und K', und durch diese führt je ein Platindraht, der die Platin-

[1]) Zu einer Reihe von Versuchen diente auch eine Platinschale von 130 ccm Inhalt, die als Anode fungierte, während die Kathode aus einer Platinscheibe bestand.

[2]) Bei Zugabe von Säuren, Alkalien oder Salzen können vielfach andere Reaktionsprodukte als bei rein wässerigen Lösungen entstehen. Das Elektrodenmaterial scheint nur von geringerem Einflusse zu sein. Denn bei Anwendung von Quecksilber-Platin und von Quecksilber-Kupferpolen wurden in einigen Fällen bei rein wässerigen Flüssigkeiten qualitativ ähnliche Veränderungen beobachtet.

elektroden P und P' trägt. Neben den Platindrähten ist so viel Raum in den Capillaren, daß die entwickelten Gase abziehen und mit einer feinen Pipette Proben der Flüssigkeit entnommen werden können.

Das Gefäß selbst ist aus dunkelem Glase, um einen etwaigen Einfluß des Tageslichtes auszuschließen.

Bei empfindlichen Verbindungen wurde eine Kontrollprobe in derselben Apparatur ohne Stromeinschaltung vorgenommen.

Veränderungen verschiedener Substanzen durch den Strom.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
1.	Äthylenglykol	Glykolaldehyd (p-Nitrophenylosazon, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte); ferner reichlich Formaldehyd und daneben Säuren; keine Naphthoresorcinreaktion.[1]
2.	Glycerin	Glycerose (Glycerosazon, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte), ferner Formaldehyd und Säuren; keine Naphthoresorcinreaktion.
3.	m-Erythrit	Erythrose (Tetrosazon, Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Kälte); Formaldehyd minimal, dagegen Ketosäure (basisches orangefarbenes Bariumsalz), enorme Naphthoresorcinprobe mit typischem Streifen wie bei Glucuronsäure. Daß diese aber nicht vorlag, folgt aus dem absolut negativen Ausfall der Reaktionen mit Orcin und Phloroglucin.
4.	l-Arabit	l-Arabinose (Diphenylhydrazon); das Reduktionsvermögen, das sich schon in der Kälte geltend macht, ist wohl auf Arabinoson oder Ketose zu beziehen. Starke Orcin- und Phloroglucinprobe, aber negative Naphthoresorcinreaktion. Kein Formaldehyd, aber Säuren.
5.	Adonit	Pentose (i-Arabinosephenylosazon); sonst wie bei l-Arabit.
6.	d-Mannit	Linksdrehende, stark reduzierende Flüssigkeit (d-Fructose), reichlich d-Glucosephenylosazon. letzteres fällt z. T. schon in der Kälte aus, was von etwas Oson herrührt. Säuren der Kohlenhydrat-

[1]) Bezüglich der Naphthoresorcinreaktion siehe die Ausführungen von J. A. Mandel u. C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 148, 1908.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
		reihe, positive Naphthoresorcinprobe, aber auch nicht Spuren von Formaldehyd, gärt mit Bierhefe in wenigen Minuten.
7.	Dulcit	Optisch-inaktive, stark reduzierende Flüssigkeit, i-Galactosazon. Im übrigen wie bei d-Mannit. Ebenfalls frei von Formaldehyd, wie u. a. aus dem Gärungsvermögen folgt.
8.	m-Inosit	Die anfangs minimale Stromleitung bessert sich nach 10 Minuten. Nach 15 Minuten bereits Reduktion von Fehlingscher Lösung in der Wärme. Nach $1^1/_2$ Stunden Reduktion schon in der Kälte; positive Naphthoresorcinprobe mit starker Fluorescenz.
9.	d-Quercit	Mit Barytwasser entsteht ein flockiges, gelbes Salz im Gegensatz zum Ausgangsmaterial. Nach 40 Minuten Reduktion von Fehlingscher Lösung, atypische, grasgrüne Naphthoresorcinprobe.
10.	d-Weinsäure	Außer den früher von uns beschriebenen Produkten überall positive Naphthoresorcinprobe, die wohl auf die entsprechende Keto- bzw. Aldehydsäure zu beziehen ist. Bei den höheren Gliedern treten bei fortgesetzter Elektrolyse auch kleine Mengen Osone der zunächst gebildeten Zucker auf.
11.	d-Zuckersäure	
12.	l-Äpfelsäure	
13.	d-Gluconsäure	
14.	d-Galactonsäure	
15.	d-Mannonsäure	
16.	l-Arabonsäure	
17.	l-Xylonsäure	
18.	d, l-Erythronsäure	
19.	d, l-Glycerinsäure	
20.	Melibionsäure	
21.	d-α-Glucoheptonsäure	d-Glucose, positive Naphthoresorcinreaktion, kein Formaldehyd, Gärung mit Bierhefe, etwas Glucoson.
22.	d-α-Glucoheptose	Reduktionsvermögen in der Kälte, Heptoson, daneben Ketosäure, die durch Barytwasser sowie Bleiessig fällbar ist und starke Naphthoresorcinreaktion gibt. Formaldehyd entsteht nicht.
23.	d-Glucose	Nach 18 Stunden intensives Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung momentan in der Kälte, ebenso nach kurzer Zeit gegen Kupferacetat. Schwache Orcin- und starke Naphthoresorcinprobe. Mit Barytwasser flockiges, gelbes, basisches Bariumsalz; im Gegensatz zur Ausgangssubstanz auch durch Bleiessig fällbar, in dessen Überschuß sich der Niederschlag wieder

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
		löst. Mit Phenylhydrazin in der Kälte momentan Trübung, die sich schnell zu einem Öle verdichtet. Das Filtrat von diesem gibt bald in der Kälte d-Glucosazon, von Oson herrührend. Kein Formaldehyd, gärt mit Hefe.
24.	d-Fructose	Nach 18 Stunden die gleichen Erscheinungen wie beim Traubenzucker; ebenfalls kein Formaldehyd; die Osonbildung ist noch stärker, erhebliche Abscheidung von Phenylosazon bereits in der Kälte.
25.	Rohrzucker	Hydrolyse schon nach 40 Minuten nachweisbar, Reaktionen wie bei Glucose und Fructose. Die Veränderungen traten auch ein, wenn vor Beginn der Stromzuführung verdünnte Natronlauge zugesetzt war.
26.	Raffinose	Wie bei Rohrzucker; keine Formaldehydbildung. Gärungsvermögen.
27.	α-Methylglucosid	Die anfangs nicht wahrnehmbare Stromleitung stellt sich nach etwa 25 Minuten ein. Nach 45 Minuten bereits Reduktion von Fehlingscher Lösung. Nach 24 Stunden qualitativ dieselben Reaktionen wie beim Traubenzucker.
28.	β-Methylglucosid	Hydrolyse usw. wie bei der α-Verbindung.
29.	Stärke	Die Stromleitung setzt nur sehr langsam ein; erst nach 4 bis 5 Tagen ist reduzierender Zucker nachweisbar, doch noch viel Stärke unzerlegt.
30.	Glycogen	Wird etwas leichter als Stärke hydrolysiert; nach 20 Stunden ist Reduktionsvermögen, aber nach 3 Tagen noch unangegriffenes Glykogen vorhanden.
31.	Inulin	Nach 12 Stunden ist bereits Fruchtzucker gebildet, nach $1^1/_2$ Tagen ist so viel entstanden, daß mit Hefe Gärung erfolgt. Weiterhin treten dieselben Produkte wie bei d-Fructose auf.
32.	Amygdalin	Stromleitung anfangs nicht wahrnehmbar. Nach 12 Stunden Bittermandelölgeruch, Reduktion von Fehlingscher Lösung und positive Naphthoresorcinprobe.
33.	Helicin	Nach 10 Minuten beginnt der Stromdurchgang. Nach 15 Minuten bereits Abspaltung von Zucker, färbt sich gelb. Nach 12 Stunden braun, sehr starkes Reduktionsvermögen, wird mit Natronlauge fast schwarz. Probe mit Naphthoresorcin negativ, offenbar verbinden sich mit dem Reagens die

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
		Umwandlungsprodukte des aromatischen Paarlings.
34.	Mentholglucuronsäure	Hydrolyse, Mentholabspaltung, Reduktion von Fehlingsche Lösung.
35.	Phenolglucuronsäure	Hydrolyse, Reduktionsvermögen, Bräunung durch Veränderung des Phenols.
36.	Glykokoll	Neben den bereits bekannten Produkten[1]) (Äthylendiamin, Ameisensäure CO_2, CO, NH_3, N usw.) entstehen Formaldehyd- und Glyoxylsäure. Dementsprechend positive Reacktion mit Naphthoresorcin und mit Indol nach Hopkins[2]).
37.	d, l-Alanin	Acetaldehyd, alkalische Reaktion, Ammoniakabspaltung, daneben etwas Diamin (wahrscheinlich Diaminobutan).
38.	d, l-Amino-n-buttersäure	Propionaldehyd, saure Reaktion, Loslösung der Aminogruppe als Ammoniak.
39.	d, l-Amino-isovaleriansäure	Isobutylaldehyd, saure Reaktion, Ammoniakabspaltung.
40.	l-Leucin	Isovaleraldehyd, saure Reaktion, Ammoniakabspaltung.
41.	d, l-Phenylaminoessigsäure	Benzaldehyd, saure Reaktion, Ammoniakabspaltung, positive Naphthoresorcinprobe.
42.	l-Tyrosin[3])	Fehlingsche Lösung reduzierender Körper, mit Phenylhydrazin und p-Nitrophenylhydrazin krystallinische Niederschläge. Mit $FeCl_3 + NH_3$ Violettfärbung. Positive Naphthoresorcinprobe. Ammoniakabspaltung. Bildung von braunen, melaninartigen Flocken, die in Laugen und Ammoniak löslich sind.
43.	l-Asparaginsäure	Nach 20 Stunden starkes Reduktionsvermögen gegen ammoniakal. Silberlösung (Spiegelb.), NH_3-Loslösung. Nach weiteren 20 Stunden positive Naphthoresorcinprobe. Mit p-Nitrophenylhydrazin ein in roten Krystallen ausfallender Niederschlag, wahrscheinlich Derivat einer Aldehydsäure.

[1]) Siehe weiter unten.

[2]) Die Reaktion mit Indollösung + conc. H_2SO_4 (Rotviolettfärbung) tritt häufig nach der Stromeinwirkung auf, so bei Glycol, Glycerin. Erythrit, Adonit, Alanin, Cystin, Adenin, Milz- und Hefenucleinsäure usw.

[3]) Gelöst unter Zusatz der doppelten Menge der theoretisch erforderlichen Quantität $^n/_1$-Schwefelsäure.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
44.	d-Glutaminsäure	Verhält sich der Asparaginsäure analog.
45.	d, l-Serin	Glykolaldehyd, starke Reduktion von Fehlingscher Lösung, schon in der Kälte Ammoniakabspaltung, positive Naphthoresorcinreaktion.
46.	d, l-Isoserin	Aminoacetaldehyd, nachweisbar durch Verwandlung in Pyrazin, daneben Ammoniakabspaltung. Positive Naphthoresorcinprobe. Starkes Reduktionsvermögen schon in der Kälte.
47.	α-β-d, l-Diaminopropionsäure	Starke Reduktion von Fehlingscher Lösung schon in der Kälte; Ammoniakabspaltung, positive Naphthoresorcinprobe (Streifen in Grün); gibt mit p-Nitrophenylhydrazin reichlich Glykolaldehyd-p-nitrophenylosazon.
48.	Tryptophan	Schwache Reduktion von Fehlingscher Mischung, mit alkalischer Silberlösung starker Spiegel, Ammoniakabspaltung, Naphthoresorcinreaktion angedeutet; braune Pigmentflocken, löslich in Alkalien. Nach dem Kochen damit und Ansäuern wurde mehrmals, doch nicht regelmäßig, eine trübe Lösung beobachtet, die an Chloroform Spuren eines rötlichblauen Farbstoffes abgab.
49.	d-Glucosaminsäure	Die Stromleitung setzt nach 10 Minuten ein; nach 20 Minuten zeigen Reduktionsvermögen und positive Orcinprobe den Beginn der Umwandlung an. Nach 20 Stunden starke Naphthoresorcinreaktion.
50.	l-Cystin	2,4 g gelöst in 20 ccm $^n/_1$-NaOH und 130 ccm Wasser. Nach 38 Stunden ist die alkalische Reaktion in eine saure umgeschlagen. Der bleischwärzende Schwefel ist verschwunden und dafür Schwefelsäure entstanden, daneben ist ein wenig elementarer Schwefel ausgeschieden (intermediäre Bildung von Thiosulfat [?]). H_2S, Mercaptan und Sulfide fehlen. NH_3 ist abgespalten. Die Flüssigkeit reduzierte schwach Fehlingsche Mischung, intensiv Silberlösung. Naphthoresorcinprobe angedeutet. Mit p-Nitrophenylhydrazinacet geringe Fällung.
51.	d, l-Phenylalanin	Leitet den Strom sehr schlecht. Nach 24 Stunden ist Abspaltung von NH_3 und Geruch nach Phenylacetaldehyd nachweisbar. Reduziert alkal. Silberlösung, nach 72 Stunden auch Fehlingsche Mischung. Schwach positive Naphthoresorcin-

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
		probe, Abscheidung alkalilöslicher brauner Flocken.
52.	Adrenalin	Die Lösung der freien Base färbt sich wenige Minuten nach dem Stromdurchgange dunkel. Nach 36 Stunden sind braune Flocken abgeschieden und sämtliche Reaktionen des Adrenalins, auch die Reduktion von Fehlingscher Mischung verschwunden. Die Flüssigkeit zeigt saure Reaktion.
53.	Adenin	Die Lösung nimmt saure Reaktion an. Nach 40 Stunden ist Loslösung von Ammoniak zu bemerken. Unverändertes Adenin nicht mehr nachweisbar. Mit ammoniakalischem Silbernitrat, sowie $CuSO_4 + NaHSO_3$ nur wenig Purinfällung. Reduziert Silberlösung in der Wärme unter Spiegelbildung. Mit Indollösung + konzentrierter H_2SO_4 positive Reaktion von Hopkins auf Glyoxylsäure; dementsprechend auch positive Naphthoresorcinprobe.
54.	Phenolätherschwefelsäure	Das Kaliumsalz spaltet bei 14stündiger Elektrolyse Schwefelsäure ab. Die Flüssigkeit färbt sich dabei hellbraun. Das primär entstehende Phenol wird in einen Fehlingsche und ammoniakalische Silber-lösung intensiv reduzierenden, mit $FeCl_3$ sich grün färbenden Körper umgewandelt.
55.	Seidenfibroinpepton	Flüchtige Aldehyde (darunter Formaldehyd und Acetaldehyd), Ammoniakabspaltung, starkes Reduktionsvermögen gegen alkalische Silberlösung, positive Naphthoresorcinprobe. Die Biuretreaktion ist verschwunden.
56.	Witte-Albumosen	Nach 20 Stunden Aldehyde, Ammoniakabspaltung, Reduktion von alkalischer Silberlösung. Nach weiteren 20 Stunden Reduktion auch von Fehlingscher Mischung, positive Naphthoresorcinprobe. Die Biuretreaktion ist nur noch angedeutet.
57.	Gelatine	Ähnlich den Witte-Albumosen. Die Biuretprobe ist nach dreitägiger Elektrolyse noch positiv.
58.	Indol[1])	Indolgeruch verschwunden, gelbbraune Flocken,

[1]) Unter Zusatz von 1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, da die reine Indollösung auch 12 Stunden nach der Stromeinschaltung noch nicht leitete.

Nr.	Ausgangssubstanz	Natur des beim Stromdurchgang entstandenen Körpers oder Angabe von Eigenschaften, welche das Reaktionsprodukt zum Unterschiede vom Ausgangsmaterial aufweist.
		die in Alkalien löslich sind. Kein Indoxyl oder Indigo unter diesen Bedingungen.
59.	Glycerinphosphorsäure	Nach 6 Stunden Abspaltung von Phosphorsäure, Reduktion von Fehlingscher Lösung, positive Orcin-, aber nur schwache Naphthoresorcinprobe.
60.	Lecithin[1])	Die trübe Flüssigkeit ist in eine völlig klare Lösung verwandelt, reagiert nach 24 Stunden alkalisch und reduziert ammonikalische Silbermischung schon in d. Kälte. (Das Ausgangsmaterial reagierte sauer und schwärzte Ag-Lösung auch beim Kochen nur minimal.) Schwache Reduktion von Fehlingscher Flüssigkeit. Orcinprobe angedeutet, Naphthoresorcinreaktion positiv. H_3PO_4 mit Molybdän- und Magnesiamischung fällbar.
61.	Hefenucleinsäure	Die Flüssigkeit reduziert alkalische Silberlösung unter Spiegelbildung und scheidet aus Fehlingscher Mischung — namentlich nach dem Wegkochen des gebildeten Ammoniaks — rotes Kupferoxydul ab. Die gelbliche Flüssigkeit schäumt nicht mehr und ist farblos geworden; beim Kochen mit Natronlauge erfolgt Gelbfärbung unter NH_3-Entwicklung. Die abgespaltene freie Phosphorsäure ist im Gegensatz zum Ausgangsmaterial durch Molybdänlösung und Magnesiamixtur fällbar. Mit ammoniakalischer Silberlösung in der Kälte sowie mit $CuSO_4 + NaHSO_3$ Niederschläge von Purinenverbindungen. Positive Naphthoresorcinreaktion, die dem Ausgangsmaterial selbst in 20 mal stärkerer Konzentration fehlt. Die somit wahrscheinlich vorhandene Carbonylsäure gibt sich nach genauer Ausfällung der abgespaltenen Phosphorsäure durch Bildung eines flockigen orangefarbenen Salzes beim gelinden Erwärmen mit überflüssigem Barytwasser zu erkennen; außerdem konnte eine kleine Menge eines in heißem Wasser löslichen Osazons vom Schmelzpunkt 157° (Pentosazon ?) dargestellt werden.
62.	Paranucleinsäure (v. E. Salkowski)	Abspaltung von Phosphorsäure und Ammoniak, positive Naphthoresorcinreaktion, Bildung von Aldehyden.
63.	Milznucleinsäure	Verhalten analog dem der Hefenucleinsäure.

[1]) Auch andere Vertreter der wichtigen Klasse der Lipoide werden durch den Strom verändert.

Erhebliche, durch den elektrischen Strom hervorgerufene Reaktionen sind, wie ersichtlich, bei fast allen physiologisch wichtigen Substanzen zu beobachten. Die Umwandlungen führen meist zu mehreren Körpern, deren Bildung zum Teil auf weitere Veränderungen der zuerst entstandenen Produkte zurückzuführen ist.

Über das Verhalten der Aminosäuren, Peptide, Albumosen und Proteine, der organischen Phosphorverbindungen und Nucleinsäuren, der Polysaccharide und gepaarten Kohlenhydrate gegen den elektrischen Strom lag bisher so gut wie überhaupt kein Material vor.

Die übrigen in der Tabelle angeführten Verbindungen haben wir vielfach in anderer Weise der Wirkung des Stromes ausgesetzt, als das sonst geschehen ist. Deshalb weichen die Resultate unserer Versuchsanordnung von den früheren nicht unwesentlich ab. Das gilt namentlich für die einfachen Substanzen der Kohlenhydratreihe.

Z. B. hat Renard[1]) den Traubenzucker in schwefelsaurer Lösung untersucht und gibt an; Ameisensäure, Zuckersäure, Trioxymethylen bzw. Formaldehyd, Kohlensäure und Kohlenoxyd erhalten zu haben;[2]) O'Brien Gunn will auch Mannit beobachtet haben. Nach Brown entstehen Acetaldehyd, Ameisen- und Essigsäure usw., nach Berthelot Äthylalkohol, nach Maumené auch Milchsäure[3]).

Diese Angaben stammen überdies teilweise aus einer Zeit, die vor den Kohlenhydratarbeiten Emil Fischers liegt, und sind demnach zu beurteilen. So kommt es, daß die Bildung des Glucosons und der Carbonylsäure überhaupt nicht gefunden worden ist, während Formaldehyd bei der Elektrolyse an Platinpolen ohne Zusatz starker Mineralsäuren auch nicht in Spuren auftritt.

Auf methodische Unvollkommenheiten ist es wohl zurückzuführen, daß bei der Elektrolyse des Rohrzuckers früher nur die Endprodukte einer weitgehenden Oxydation, wie Kohlendioxyd oder Oxalsäure, beobachtet sind.

Eine Überführung der mehrwertigen Alkohole durch den elektrischen Strom in reduzierende Verbindungen ist von van Deen (1863), Renard (1875) u. a. bei saurer wie alkalischer Reaktion ausgeführt. Neben den meist recht unvollkommenen charakterisierten kohlenhydratartigen Substanzen — sie sind z. T. einfach als Traubenzucker oder Isomere bezeichnet — sind entsprechende Mono- und Dicarbonsäuren, Formaldehyd bzw. Trioxymethylen sowie Oxydationsendprodukte beschrieben.

---

[1]) Ann. Chim. et Phys. [5] 17, 289, 1879.

[2]) Siehe hierzu besonders die Ergebnisse von Loeb (diese Zeitschr. 17, 132) bei der Elektrolyse von Glucose in schwefelsaurer Lösung an Bleipolen.

[3]) Die Literatur s. bei v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten I. u. II.

Eine genaue Untersuchung über das Verhalten von reinen Aminosäuren gegen den elektrischen Strom liegt nur für das Glykokoll vor; sie ist von Kühling[1]) ausgeführt und ergab H, O, CO, CO_2, N, NH_3, Äthylendiamin und Ameisensäure.

Die in der Tabelle zusammengestellten Veränderungen durch den elektrischen Strom geben sich unter den angewandten Bedingungen im ganzen als oxydative und hydrolytische Spaltungen zu erkennen.

Im einzelnen zeigt sich folgendes:

I. Die mehrwertigen Alkohole gehen in die zugehörigen Oxyaldehyde oder Oxyketone über. Daneben treten Kohlenhydratsäuren[2]) zum Teil auch Carbonylsäuren auf. Vom Erythrit abwärts bis zum Glykol wird in zunehmenden Mengen Formaldehyd gebildet, der bei Pentiten und Hexiten fehlt.

II. Die Kohlenhydratsäuren mit geradliniger Kette gehen in die um ein Kohlenstoffatom ärmeren Aldosen über. Daneben entstehen Carbonylsäuren und bei fortgesetzter Stromeinwirkung in der C_7- und C_6-Reihe auch kleine Mengen Osone.

III. Monosaccharide liefern Osone und Carbonylsäuren.

IV. Di- und Trisaccharide werden hydrolysiert und wie die Monosaccharide weiter verändert.

V. Polysaccharide werden hydrolytisch gespalten.

VI. Glucoside und gepaarte Glucuronsäuren werden zerlegt.

VII. Aminosäuren werden nach Loslösung von Ammoniak in die um ein Kohlenstoffatom ärmeren Aldehyde verwandelt. (Aldehydspaltung von Aminosäuren.) Prinzipiell ebenso verhalten sich Oxy- und Diaminosäuren. Aus Aminodicarbonsäuren scheinen Aldehydsäuren hervorzugehen. Gleich dem Glykokoll gibt sein nächst höheres Homologes ein alkalisch reagierendes Produkt (Diamine). Von der Aminobuttersäure an ist die Reaktionsflüssigkeit sauer und enthält neben Ameisensäure andere Säuren,[3]) die zum Teil an Ammoniak gebunden sind.

VIII. Peptone und Proteide werden hydrolysiert und z. T. wie die Aminosäuren unter Abspaltung von Ammoniak usw. in Aldehyde umgewandelt.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 1638, 1905.

[2]) Auf die Untersuchung dieser sekundär gebildeten Substanzen sowie auf die häufig auftretende Ameisensäure ist kein Gewicht gelegt.

[3]) Diese sekundär entstandenen Säuren sind vorläufig nicht untersucht.

IX. Phosphatide werden hydrolysiert und die Spaltungsprodukte weiter verändert.

X. Nucleinsäuren werden zerlegt und die Spaltungsprodukte weiter umgewandelt.

Diese Veränderungen[1]) treten unter dem Einflusse des elektrischen Stromes schon nach wenigen Minuten auf, wenn auch Stunden und selbst Tage oft zu einer völligen Zersetzung des Ausgangsmaterials erforderlich sind.

In allen den angeführten Beispielen tritt deutlich eine abbauende Tendenz des elektrischen Stromes zutage und sein Bestreben, nach Art bestimmter Fermente (Oxydasen, Desamidasen, Decarboxylasen, hydrolysierender Enzyme) aus indifferenten Stoffen des Pflanzen- und Tierleibes höchst reaktionsfähige Carbonylverbindungen[2]) zu erzeugen. Diese Aldehyd- oder Ketonkörper, die häufig ein kleineres Molekül als ihre Muttersubstanzen besitzen, zeigen ihrerseits bekanntlich außerordentliche Neigung zu synthetischen Prozessen. Es gibt sich dadurch der elektrische Strom als ein Agens zu erkennen, das in wirksamer Weise den Ab-, Um- und Aufbau in den Organismen zu beeinflussen vermag.

Vergleicht man diese Befunde mit unseren früher beschriebenen Reaktionen der katalytischen Lichteinwirkung auf

[1]) Diese Versuche haben übrigens nichts mit den Experimenten von J. Rosenthal (Sitzungsber. d. Kgl. Pr. Akad. d. Wiss. 1908, 20) „Über die Zerlegung hochkomplizierter chemischer Verbindungen im schwankenden magnetischen Kraftfeld", zu tun. Bei ihnen handelt es sich um keine Elektrolyse oder sekundär elektrolytische Vorgänge, sondern um die Wirkung magnetischer Kraftlinien. Ein Strom wird dabei überhaupt nicht in die Substanz geleitet, sondern diese befindet sich in einem Solenoid, und wenn das in ihm bestehende magnetische Feld in geeigneter Weise zum Schwanken gebracht wird, so können komplizierte Substanzen eine Hydrolyse erfahren. Von Oxydation, Desamidierung, Decarboxylierung usw. der hydrolytischen Spaltungsprodukte ist dabei keine Rede. Ferner ist die Schwingungsfrequenz für jede Substanz eine andere und muß jedesmal besonders ausprobiert werden.

[2]) Auf die häufige Entstehung von Carbonylsäuren sei im Hinblick auf ein Auftreten solcher Substanzen im Tierkörper (O. Neubauer, Deutsch. Arch. f. Klin. Medicin 95, 211, 1909) besonders aufmerksam gemacht. Ob die in vielen Fällen (s. Seite 276) beobachtete Reaktion mit Indollösung + conc. Schwefelsäure (nach Hopkins) auf Glyoxylsäure zu beziehen ist, dürfte zweifelhaft sein, denn es hat sich gezeigt, daß z. B. Oxybrenztraubensäure die gleiche Farbenreaktion gibt.

dieselben Substanzen, so sieht man, daß in den prinzipiellen Punkten eine weitgehende Analogie besteht. Diese auf den ersten Blick auffällige Verwandtschaft in der Wirkungsweise von Licht und elektrischem Strom findet ihre Erklärung in der elektromagnetischen Lichttheorie,[1]) nach der ja Licht und Elektrizität Schwingungszustände desselben Mediums darstellen.

Experimentelles.

(Zum Teil mitbearbeitet von cand. phil. Oehler.)

Zur Darlegung der quantitativen Verhältnisse seien die folgenden Beispiele herausgegriffen.

a) d-Mannit.

9,1 g d-Mannit wurden in 250,0 ccm Wasser gelöst und in der angegebenen Weise dem Strome ausgesetzt. Nach 20 Minuten setzte die Stromleitung ein, nach 40 Minuten reduzierte die Flüssigkeit bereits Fehlingsche Mischung.

Nach 22 Stunden drehte die Lösung die Ebene des polarisierten Lichtes nach links und gab eine enorme Seliwanoffsche Reaktion, deshalb darf das Reduktionsvermögen wohl in erster Reihe auf d-Fructose bezogen werden; es entsprach einem Gehalt von 4,1 g Fruchtzucker.

Bei Behandlung mit essigsaurem Phenylhydrazin (und Methylphenylhydrazinacetat) fiel bereits in der Kälte in wenigen Minuten etwas Osazon aus, das auf die Gegenwart von Oson zurückzuführen ist.

Die Hauptmenge schied sich erst bei einstündigem Erwärmen im Wasserbade ab. Ihm beigemengt war eine ölige Substanz, die eine Phenylhydrazinverbindung der vorhandenen und die Naphthoresorcinprobe gebenden Carbonylsäure ist. Durch Umkrystallisieren zunächst aus wässrigem Alkohol, dann aus verdünntem Pyridin wurden 0,633 g typisches d-Glucosazon erhalten, das bei raschem Erhitzen bei 208° schmolz.

$$C_{18}H_{22}N_4O_4 \quad \text{Ber. } N = 15{,}64\,\%,$$
$$\text{gef. } N = 15{,}41\,\%.$$

0,20 g Osazon zeigten im Pyridin-Alkoholgemisch eine Linksdrehung von — 1° 27′.

---

[1]) Bezügl. der Theorie s. Wilder D. Bancroft, Journ. of Physical Chemistry 12 u. 13, sowie C. G. Schluederberg, ebenda.

Die Bildung von Fruchtzucker wurde auch an der Hand der Gärungsprobe festgestellt. Da die elektrolysierte Flüssigkeit deutlich sauer war, wurde ein Teil mit etwas verd. Natronlauge abgestumpft und bei noch schwach saurer Reaktion mit Hefe versetzt. Im Gärungsröhrchen war bereits nach 10 bis 15 Minuten lebhafte Kohlensäureentwicklung zu konstatieren.

Nach beendeter Vergärung drehte die vorher lävogyre Flüssigkeit schwach rechts und reduzierte noch wegen des Gehaltes an Oson und Carbonylsäure. Letztere war übrigens durch gelindes Erwärmen mit Barytwasser als orangefarbenes basisches Bariumsalz teilweise fällbar und gab die Naphthoresorcinprobe; diese trat mit dem direktem Produkt der Elektrolyse nur dann deutlich positiv auf, wenn man wenig Flüssigkeit und viel Naphthoresorcin anwendete. Denn sonst belegt die Fructose das Naphthoresorcin mit Beschlag. (Daraus ergibt sich für alle ähnlichen Fälle, wo neben viel Zucker wenig Carbonylsäure vorhanden ist, die Regel, bei Anstellung der Probe für hinreichend Naphthoresorcin zu sorgen.)

Die leichte, direkte Vergärbarkeit zeigte auch die völlige Abwesenheit von Formaldehyd, der ein starkes Hefengift ist. (Ein Zusatz von Formalin zu der Elektrolysenflüssigkeit im Verhältnis von 1:10000 hob sofort die Gärung auf.)

Von flüchtigen Produkten waren nur Ameisensäure und Spuren einer reduzierenden Substanz nachweisbar; vorhanden waren dagegen ferner nicht flüchtige Säuren, die jedoch nicht näher untersucht worden sind.

b) Dulcit.

Eine Lösung von 4,55 g Dulcit in 250 ccm Wasser verhielt sich gegen den Strom ähnlich wie die des Mannits. Das nach 22 Stunden in reichlicher Menge erhältliche Phenylosazon erwies sich nach dem Umkrystallisieren durch den Schmelzpunkt 202 bis 203°, durch die optische Inaktivität und die Analyse als d,l-Galactosazon.

$$C_{18}H_{22}N_4O_4 \quad \text{Ber. } N = 15{,}64\,\%,$$
$$\text{gef. } N = 15{,}76\,\%.$$

Entsprechend der schwereren Vergärbarkeit von Galactose und der Unangreifbarkeit der l-Komponente durch die Zymase

verlief die Gärung langsamer und war erst nach 2 Stunden deutlich.

Ihr Eintritt einerseits, der negative Ausfall der chemischen Reaktionen auf Formaldehyd andererseits taten auch hier dessen Abwesenheit dar.

c) l-Arabit.

7,6 g l-Arabit wurden in 250 ccm Wasser gelöst und 22 Stunden elektrolysiert. Nach 30 Minuten war der Stromdurchgang zu erkennen, nach 45 Minuten schon die Bildung reduzierender Substanzen nachweisbar.

Nach der angegebenen Zeit reduzierte die Flüssigkeit Fehlingsche Mischung bereits in der Kälte (Oson). Das Reduktionsvermögen entsprach einem Gehalt von 3,30 g Arabinose. Dasselbe ist jedoch zu einem erheblichen Teil auf andere Substanzen zu beziehen. Denn die aus 100 ccm der Lösung mit Diphenylhydrazin, das bekanntlich die geeignetste Verbindung zur quantitaven Isolierung kleiner Mengen Arabinose ist, erhaltene Quantität schwerlösliches Hydrazon betrug nur 0,130 g.

l-Arabinosephenylosazon war in einer Ausbeute von 0,55 g aus 75 ccm der Flüssigkeit erhältlich. Es schmolz nach zweimaliger Krystallisation aus heißem Wasser bei 159°; 0,20 g zeigten im Pyridin-Alkoholgemisch eine Drehung von $+1^{0}\ 11'$.

$C_{17}H_{20}N_4O_3$. Ber. N = 17,07 %,
gef. N = 17,21 %.

Die Tollensschen Pentosenproben mit Orcin und Phloroglucin fielen sehr stark aus, die Naphthoresorcinreaktion war negativ. Formaldehyd war nicht nachweisbar.

d) m-Erythrit.

12,2 g Erythrit in 500 ccm Wasser wurden in 2 Portionen zu je 250 ccm jedesmal 22 Stunden elektrolysiert. Die Flüssigkeit reduzierte Fehlingsche Lösung schon in der Kälte. Auf Zusatz von Phenylhydrazinacetat fiel fast momentan ein gelbrotes Öl aus, das abfiltriert wurde. Aus der Mutterlauge schied sich nach $1^1/_2$ stündigem Erwärmen im Wasserbade oder noch besser bei 3 tägigem Stehen im Brutschranke bei 40° reichlich d,l-Erytrosazon aus. Die Ausbeute daran belief sich (im Brutschrankversuch) auf 0,665 g aus 175 ccm der Lösung.

Das Osazon schmolz nach dem Umkrystallisieren aus siedendem Benzol bei 163°.

$C_{16}H_{18}N_4O_2$. Ber. N = 18,80%,
gef. N = 18,54%.

Die Flüsssigkeit enthielt ferner eine Carbonylsäure, die bei gelindem Erwärmen mit Barytwasser als gelbes basisches Salz ausfiel. Dementsprechend war die Naphthoresorcinreaktion stark positiv und zeigte eine Nuance und ein Spektralbild, das von dem für Glucuronsäure nicht zu unterscheiden war. Daß trotzdem nicht etwa letztere zugegen war, folgte u. a. einfach schon daraus, daß die Orcin- und Phloroglucinreaktion absolut negativ verliefen.

Weiter trat hier Formaldehyd auf. Sowohl in dem Gemisch der Umwandlungsprodukte als im Destillate konnte er mit p-Diphenyldihydrazin nachgewiesen werden. Die Quantität war aber nur gering, sie betrug 0,091 g des Hydrazons für 200 ccm der elektrolysierten Flüssigkeit.

e) Glycerin.

9,2 g wasserfreies Glycerin in 500 ccm Wasser wurden in 2 Portionen zu je 250 ccm jedesmal 22 Stunden elektrolysiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine intensive Reduktion von Fehlingscher Mischung schon in der Kälte, die einem Gehalt von 4,7 g Glucose[1]) entsprach.

Daneben verriet sich ein erheblicher Gehalt an Formaldehyd bereits durch den Geruch. Durch Fällung mit p-Diphenyldihydrazin in alkoholischer Lösung konnte derselbe direkt ermittelt werden und ergab sich zu 0,2686 g für 200 ccm Flüssigkeit = 7,30%.

Zur Darstellung des Glycerosazons verfuhr man wegen der gleichzeitigen Anwesenheit von Formaldehyd so, daß man mit essigsaurem Phenylhydrazin 10 Minuten auf dem Wasserbade erwärmte. Dabei schieden sich Formaldehydphenylhydrazon in Öltropfen ab, die unter Beigabe von etwas Knochenkohle abfiltriert wurden. Das klare Filtrat lieferte bei mehrtägigem Stehen im Brutschranke bei 40° dann Glycerosazon in ziem-

[1]) Die Zucker der 3-Kohlenstoffreihe haben nach Wohl und Piloty annähernd die gleiche Reduktionskraft wie d-Glucose.

licher Reinheit, das nach zweimaliger Krystallisation aus heißem Benzol bei 130 bis 131° schmolz.

$C_{15}H_{16}N_4O$. Ber. N = 20,89 %,
gef. N = 20,55 %.

f) Äthylenglykol.

Zur Elektrolyse dienten 6,2 g wasserfreies Äthylenglykol in 500 ccm Wasser. Stromeinwirkung 22 Stunden. Die Verarbeitung der schon in der Kälte reduzierenden und stark nach Formaldehyd riechenden Flüssigkeit geschah wie beim Glycerin.

Die Menge des durch sein p-Nitrophenylosazon charakterisierten Glykolaldehyds betrug 1,35 g, die Quantität des als Diphenyldihydrazon abgeschiedenen Formaldehyds 0,1271 g pro 100 ccm = 10,25 %.

Das p-Nitrophenylosazon wurde in bekannter Weise durch Lösen in heißem Pyridin und Ausfällen mit Toluol von Beimengungen befreit und in weinroten Nadeln vom Schmelzpunkt ca. 307° erhalten.

$C_{14}H_{12}N_6O_4$. Ber. N = 25,61 %,
gef. N = 26,02 %.

Betrachtet man die Ergebnisse der Elektrolyse in der fortlaufenden Reihe Hexit, Pentit, Tetrit, Glycerin und Äthylenglykol, so gewahrt man ein recht verschiedenes Verhalten. Da die angewandten Lösungen aller dieser mehrwertigen Alkohole äquimolekular ($^1/_{20}$ Mol. Gew. in 250 ccm Wasser) und alle gleich lange (ziemlich genau 22 Stunden) der Stromwirkung ausgesetzt waren, so sind deren Ergebnisse direkt vergleichbar.

In der C_6-Reihe (d-Mannit) traten neben den entsprechenden Hexosen Osone und Carbonylsäuren auf.

In der C_5-Reihe (l-Arabit, Adonit) wurden neben Pentosen Osone, aber keine Carbonylsäure beobachtet.

In der C_4-Reihe (m-Erythrit) entstanden Erythrose und Carbonylsäuren, und es stellte sich zuerst Formaldehyd ein.

In der C_3- und C_2-Reihe (Glycerin, Äthylenglykol) stieg die Formalinmenge mit abnehmender Kohlenstoffanzahl, während sich für die Gegenwart von Carbonylsäuren und Osonen neben Glycerose und Glykolaldehyd keinerlei Andeutung ergab.

So nahe es liegt, solche Befunde — dasselbe gilt für die anschließend mitgeteilten Ergebnisse mit Kohlenhydratsäuren,

Zuckern und Polysacchariden — zu spekulativen Betrachtungen über Auf- und Abbauverhältnisse in der Kohlenhydratreihe zu verwerten, so dringend muß davor gewarnt werden, so lange das experimentelle Material derartig vielseitige Deutungen zuläßt, wie das zurzeit der Fall ist.

Beachtenswert ist immerhin die leichte Abspaltbarkeit von Formaldehyd aus Glycerin und Äthylenglykol, von denen das erste in der Natur in Form der Fette, das zweite im Cholinrest der Phosphatide weit verbreitet ist.

g) d-α-Glucoheptonsäure.

Bei 24stündiger Elektrolyse einer Lösung von 5,0 g reinem, schön krystallisiertem d-α-Glucoheptonsäurelakton in 100 ccm Wasser entstand eine stark reduzierende Flüssigkeit, die wegen eines Gehaltes an unveränderter Säure sowie an durch Naphthoresorcin nachweisbarer Carbonylverbindung schwach linksdrehend war.

Die reichliche Bildung von d-Glucosazon und die glatte Vergärbarkeit durch Bierhefe zeigten, daß trotzdem Traubenzucker gebildet war. Der Gehalt an letzterem ergab sich durch eine quantitative Gärungsprobe (mit einem durch schwache Natronlauge abgestumpften und verdünnten Teile) zu 1,2°/₀.

Formaldehyd war chemisch nicht nachweisbar, und seine Abwesenheit geht auch aus der biologischen Reaktion der Vergärbarkeit hervor.

h) d-α-Glucoheptose.

Anders verlief die 24stündige Elektrolyse der d-α-Glucoheptose. 5,0 g des reinen C_7-Zuckers in 100 ccm Wasser ergaben neben unverändertem Ausgangsmaterial Heptoson, Carbonyl- und andere Säuren. d-Glucose war nicht nachweisbar, Formaldehyd ebensowenig.

i) d-Glucose.

Die Produkte, die bei der 18-stündigen Elektrolyse von 5,0 g reinem Traubenzucker in 250 ccm Wasser entstanden,[1]) sind bereits in der Übersichtstabelle aufgeführt.

---

[1]) Renard und Loeb, a. a. O. Die anderen Resultate des letztgenannten Autors sind bei einer komplizierteren Versuchsanordnung (mit getrennten Elektrodenräumen in schwefelsaurer Lösung an Bleipolen und bei

Bezüglich der quantitativen Verhältnisse sei noch folgendes angegeben.

Die Stromleitung setzte nach etwa 35 Minuten ein.

Die Quantität der unveränderten d-Glucose ergab sich durch eine quantitative Gärungsprobe mit der verdünnten und bis zur schwach sauren Reaktion mit Natronlauge abgestumpften Lösung zu 1,47 g, die Menge des gebildeten Osones aus dem in der Kälte abgeschiedenen d-Glucosazon zu 0,26 g. An basischem Bariumsalz wurden 0,92 g isoliert.

Formaldehyd bzw. Trioxymethylen, die bei Elektrolyse in schwefelsaurer Lösung gefunden worden sind, traten hier nicht auf.

k) Rohrzucker.

Die Hydrolyse einer 5°/₀igen Rohrzuckerlösung durch den elektrischen Strom war nach 36 Stunden vollständig, wenigstens nahm das Reduktionsvermögen bei Behandlung mit Inversionsmitteln nicht mehr zu.

Es waren Trauben- und Fruchtzucker sowie deren erwähnte Umwandlungsprodukte entstanden.

Die Elektrolyse der Saccharose wurde auch unter Zusatz von Natronlauge (5 ccm $^n/_1$-NaOH, 95 ccm Wasser und 2,5 g Rohrzucker) ausgeführt, um die hydrolysierende Wirkung minimaler Mengen Mineralsäuren auszuschließen, die etwa aus Spuren anorganischer Elektrolyte durch den Strom gebildet werden könnten. Nach 20 Stunden bestand noch alkalische Reaktion, und trotzdem hatte eine Spaltung stattgefunden.

Solche Elektrolysen mit Alkalizusatz haben wir auch beim β-Methylglucosid, Helicin und bei Mentholglucuronsäure ausgeführt; überall erfolgte auch im alkalischen Milieu eine Zerlegung.

l) d, l-Alanin.

a) Die Stromleitung in einer Lösung von 4,0 g racemischen Alanin in 250 ccm Wasser war zunächst schlecht, besserte sich aber nach etwa 25 Minuten. Gleichzeitig trat der charakteristische Geruch nach Acetaldehyd auf.

---

einem stets vorhandenen Überschuß an Glucose) erhalten und daher mit den Ergebnissen dieser beabsichtigt einfachen Elektrolyse an glatten Platinstreifen und ohne besonderen Elektrolytenzusatz nicht vergleichbar.

Nach 12 Stunden dienten 100 ccm der Lösung, die 1,6 g d, l-Alanin entsprachen, in bekannter Weise zur Bestimmung des abgespaltenen Ammoniaks.

Es wurden 72,8 ccm $^{n}/_{5}$-H_2SO_4 verbraucht = 0,204 g N; demnach waren rund 80% des Stickstoffs in Form von Ammoniak abgespalten.

β) In einem anderen Falle wurden 4 g d, l-Alanin in 200 ccm Wasser gelöst, 46 Stunden elektrolysiert und dann auf Acetaldehyd verarbeitet. Die deutlich alkalisch reagierende Flüssigkeit wurde mit Salzsäure schwach angesäuert, um den an Basen gebundenen Teil des Acetaldehyds nicht zu verlieren, und am absteigenden Kühler destilliert, solange noch eine alkalisch gemachte Probe ammoniakalische Silberlösung reduzierte. Das Destillat wurde zur Bindung flüchtiger Säuren mit gefälltem kohlensauren Kalk geschüttelt und nochmals rektifiziert. Es ging eine intensiv nach Acetaldehyd riechende Flüssigkeit über, die starke Aldehydreaktionen gab und mit einer essigsauren p-Nitrophenylhydrazinlösung versetzt wurde. Das erhaltene und im Vakuum getrocknete Hydrazon wurde aus benzolhaltigem Petroläther umkrystallisiert und lieferte 1,03 g Acetaldehyd-p-Nitrophenylhydrazon vom Schmelzpunkt 126 bis 127°.

$C_8H_9N_3O_2$. Ber. N = 23,50%,
gef. N = 23,84%.

Im ersten Destillationsrückstand waren neben etwas freier Salzsäure u. a. Chlorammonium und das salzsaure Salz einer Base vorhanden. Durch Eindampfen zur Trockne, Ausziehen mit Alkohol, Abdampfen, erneutes Aufnehmen mit Alkohol und dann durch Fällung mit Platinchlorid entstand das Doppelsalz einer Base, die vermutlich als ein Diaminobutan anzusprechen ist und über die später berichtet werden soll.

m) l-Leucin.

4,0 g l-Leucin wurden in 250 ccm Wasser gelöst und 36 Stunden lang elektrolysiert. Die Verarbeitung geschah wie beim inaktiven Alanin.

Es ergab sich, daß 36% des Stickstoffes als Ammoniak abgespalten waren.

Das sich schon durch den Geruch verratende Isovaleraldehyd wurde nach den Angaben von Neuberg und Nei-

mann[1]) als Thiosemicarbazon isoliert, das unscharf bei 49 bis 52° schmolz. (Dem Isovaleraldehyd war wohl aktiver Valeraldehyd beigemengt, dem das Leucin begleitenden Isoleucin entstammend.) $C_6H_{13}N_3S$. Ber. N = 26,42 %,
gef. N = 26,27 %.

n) α-β-d, l-Diaminopropionsäure.

Aus 3,0 g freier Säure, die aus dem Bromhydrat durch Silberoxyd hergestellt war, entstand durch 24stündige Elektrolyse eine Lösung, deren Eigenschaften schon in der Tabelle angeführt sind.

Ob die reduzierende Substanz Aminoacetaldehyd:

$$CH_2 . NH_2 - CH . NH_2 - COOH \longrightarrow CH_2 . NH_2 - CHO$$

oder durch weitere Desamidierung daraus gebildeter Glykolaldehyd, $CH_2 . OH - CHO$, war, wurde nicht untersucht. Das dargestellte p-Nitrophenylosazon erlaubte in dieser Richtung keine Entscheidung. Es entstand in bekannter Weise in einer Ausbeute von 0,785 g und zeigte alle charakteristischen Eigenschaften. $C_{14}H_{12}N_6O_4$. Ber. N = 25,61 %,
gef. N = 25,88 %.

o) Seidenfibroinpepton.

Die Elektrolyse von 4 g Seidenfibroinpepton in 75 ccm Wasser führte in 48 Stunden zu einer Flüssigkeit, die im Gegensatze zum Ausgangsmaterial abiuret war.

Sie enthielt Aldehyde, von denen der Formaldehyd mittels Diphenyldihydrazin und Acetaldehyd durch die Riminische Reaktion im Destillate erkannt wurden. Die positive Naphthoresorcinprobe, die dem Seidenfibroin fehlt, zeigte die Entstehung von Carbonylsäure an.

Über die reichliche Abspaltung von Ammoniak gab der Destillationsversuch mit 25 ccm der elektrolysierten Lösung Aufschluß. Die übergehende Menge verbrauchte 55,8 ccm $^n/_5$-H_2SO_4 zur Neutralisation, entsprechend 0,1563 g N.

p) Hefenucleinsäure.

Als ausgesprochene Säuren leitet die Nucleinsäure der Hefe gleich den anderen Vertretern dieser Gruppe den Strom gut von vornherein.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35, 2049, 1902.

Die Angaben der tabellarischen Übersicht seien durch folgende Daten ergänzt.

Zum Versuche diente eine Lösung von 5,0 g Hefenucleinsäure in 250 ccm Wasser. Nach 3 Stunden war bereits Phosphorsäure aus der organischen Bindung abgespalten, nach 30 Stunden war die Loslösung vollständig.

Während durch Molybdänlösung aus Hefenucleinsäure eine weißliche, gallertige Masse ausfällt, schied sich aus der elektrolysierten Flüssigkeit das typische Phosphorsäuremolybdat ab.

Die aus 50 ccm (entsprechend 1,0 g Hefenucleinsäure) erhaltene Menge wurde in das Ammoniummagnesiumsalz und dieses durch Glühen in Magnesiumpyrophosphat verwandelt. Es wurden 0,3231 g $Mg_2P_2O_7 = 0,0888$ g P oder 8,88 % erhalten. Die Hefenucleinsäure enthielt rund 9 % Phosphor.

Eine Ammoniakbestimmung in 100 ccm ergab einen Verbrauch von 21,2 ccm $^n/_5$-H_2SO_4 zur Neutralisation, d. h. 0,0594 g N. Das entsprach bei dem Gehalt der Hefenucleinsäure an 15 % N einer Abspaltung von $^1/_5$ allen Stickstoffes in der Form von Ammoniak.

Weitere Daten über das Verhalten einer Reihe physiologisch wichtiger Substanzen gegen den elektrischen Strom finden sich in der Dissertation der Herren Scott (Berlin 1908) und Lachmann (Berlin 1909), die im hiesigen Laboratorium ausgeführt sind; sie werden demnächst im Auszuge mitgeteilt. Die Untersuchungen sollen fortgesetzt und namentlich durch eine analoge Prüfung der Wechselstromwirkung erweitert werden.

Notiz über Inosinsäure

Von

C. Neuberg und B. Brahn.

(Aus der Chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

Mit unseren früheren Angaben[1]) über die Inosinsäure beschäftigten sich jüngst die Herren F. Haiser und F. Wenzel[2]) in einer Weise, die geeignet ist, dem uneingeweihten Leser ein unzutreffendes Bild der Inosinsäureforschung zu geben. So sehr es uns widerstrebt, ohne neues experimentelles Material zu einer Frage Stellung zu nehmen, so zwingt uns doch die Publikation der genannten Autoren dazu, ihre Angriffe zurückzuweisen.

Zunächst lassen die Autoren durchblicken, daß sie unsere Beschäftigung mit der Inosinsäure überhaupt für einen Übergriff auf fremdes Gebiet betrachten. Da die Inosinsäure bereits im Jahre 1847 von J. v. Liebig[3]) entdeckt, von zahlreichen anderen Autoren, darunter zuletzt von Haiser[4]) im Jahre 1895, untersucht war, konnten nach einer 12jährigen Pause in der Inosinsäureforschung wir uns 1907 unmöglich auf den Standpunkt des terrain occupé stellen, und wir betonen, daß eine gegenteilige Ansicht nicht der üblichen Auffassung entspricht.

Weiter deuten die Autoren an, daß wir die erwähnte Arbeit Haisers nicht richtig zitiert hätten. Haiser und Wenzel haben nach der Veröffentlichung unserer ersten Mitteilung schon einmal in dieser Frage — allerdings zitieren sie unsere längst erschienene Arbeit nicht — das Wort ergriffen[5]), ohne sich beeinträchtigt zu fühlen. Jetzt finden sie, daß Haiser im Jahre 1895 eigentlich schon die Pentose als Spaltungs-

---

[1]) Diese Zeitschr. 5, 438, 1907 und Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 3376, 1908.

[2]) F. Haiser und F. Wenzel, Über Carnin und Inosinsäure, II. Mitteilung. Monatsh. f. Chem. 30, 147, 1909.

[3]) Ann. d. Chem. 62, 317, 1847.

[4]) Monatsh. f. Chem. 16, 190, 1895.

[5]) F. Haiser und F. Wenzel, Über Carnin und Inosinsäure, I. Mitteilung. Monatsh. f. Chem. 29, 157, 1908.

produkt der Inosinsäure entdeckt, charakterisiert und nur „Trioxyvaleriansäure“ genannt habe!

Wer sich die Mühe macht, die Haisersche Arbeit nachzulesen, wird erstaunt sein, das Spaltungsprodukt klar und deutlich als Säure beschrieben und dazu durch die Formel $C_4H_9O_3$—COOH veranschaulicht zu finden. Von Pentosenreaktionen — hierunter versteht jedermann die bekannten Proben von Tollens mit Phloroglucin und Orcin —, die im Jahre 1889 bis 1890 beschrieben und im Jahre 1905 längst im allgemeinen Gebrauche waren, ist kein Wort erwähnt. Und wenn Haiser selbst an einer Stelle von den „Isomeren der Trioxyvaleriansäure“ spricht, so deutet auch keine Silbe darauf hin, daß er dabei an Pentose gedacht oder die Identität seiner Valeriansäure mit einem Fünfkohlenstoffzucker überhaupt nur in Betracht gezogen hätte. Die Bestimmung der Verbindungen, auf die Haiser seine Ansprüche gründet, hat er selbst (Monatsh. f. Chem. **16**, 203, 1895) als „nicht sehr vertrauenerweckend“ bezeichnet.

Bezüglich der experimentellen Tatsachen können wir uns kurz fassen. Denn entkleidet man die jetzt gemachten Angaben von Haiser und Wenzel über die Inosinsäure — mit dem Carnin bzw. Inosin haben wir uns nie beschäftigt — der oratorischen Umhüllung, so gewahrt man, daß sie bisher experimentell nicht über unsere Befunde hinausgekommen sind und ihnen in allen wesentlichen Punkten beipflichten. Sie bestätigen die hydrolytische Bildung einer Pentose, deren optische Aktivität und bei der ungespaltenen Inosinsäure das früher übersehene Drehungsvermögen. Sie berechnen das letztere und konstatieren die „außerordentlich gute Übereinstimmung“ mit unseren Daten.

Haiser und Wenzel befürworten für die Pentose (auf allerdings experimentell unzulänglicher Grundlage) die Natur der Lyxose statt Xylose und erwähnen nicht, daß wir längst zweimal diese Möglichkeit ausdrücklich hervorgehoben hatten. In der Biochem. Zeitschr. **5**, 449, 1907, Zeile 3 bis 1 von unten sagen wir:

„Selbstverständlich könnte dem l-Xylosazon auch die d-Lyxose zugrunde liegen, doch ist dieser Zucker in der Natur bisher nie beobachtet worden“,

und in unserer Mitteilung in den Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **41**, 3376, 1908 heißt es Zeile 5 bis 4 von unten:

„Die Pentose wurde in Form ihres Phenylosazons als l-Xylose (bzw. d-Lyxose) charakterisiert.“

Die Diagnose auf Lyxose ist bei Haiser und Wenzel, wie gesagt, bis jetzt äußerst schwach begründet. Sie stellen dieselbe, obgleich sie den Zucker nur als sirupöses Produkt, ohne die geringste Garantie der Reinheit in Händen hatten und obgleich ihr Sirup ein um ca. 40 % zu hohes (!) Drehungsvermögen für Lyxose aufwies. Da Lyxose und Xylose bekanntlich das identische Osazon liefern, so würde unser Befund von Xylosazon selbstverständlich auch mit einer Feststellung von Lyxose im Einklange stehen. Bei dem geringen und schwankenden Gehalte des Fleischextraktes an Ino-

sinsäure haben wir nicht so viel Zucker in Händen gehabt, um ihn selbst zur Krystallisation bringen zu können.

In eine Diskussion der Frage, ob man überhaupt berechtigt ist, Untersuchungen am phosphorsäurefreien Inosin so weitgehend auf die Inosinsäure zu übertragen, wollen wir nicht erst eintreten.

Weiter werfen uns die Autoren vor (S. 157), wir hätten der bei der Spaltung der Inosinsäure als Zwischenprodukt auftretenden Pentosephosphorsäure das Reduktionsvermögen abgesprochen. Sie übersehen dabei, daß wir (Diese Zeitschr. 7, 449, 1907) ausdrücklich ihre Osazonbildung, deren bekanntlich nur reduzierende Kohlenhydratverbindungen fähig sind, erwähnen. Im übrigen pflichten sie unseren Angaben über die Reduktionsverhältnisse bei und haben die Phenylhydrazinverbindung der Pentosephosphorsäure so wenig wie wir in reiner Form erhalten können.

Von weiteren Punkten wollen wir nur noch einen berühren, die Frage nach der Strukturformel der Inosinsäure. In dieser Zeitschr. 7, 440, 1907, sagten wir (Zeile 12 bis 14):

„Auf Grund dieser Daten kann man nunmehr daran denken, eine ungefähre Konstitutionsformel für die Inosinsäure aufzustellen."

Dann lassen wir die dabei in Betracht gezogenen Kautelen und Voraussetzungen folgen. Deren wichtigste ist die zu jener Zeit vielfach akzeptierte Anschauung Burians,[1]) daß in den Nucleinsäuren die Phosphorsäure direkt an die Purine und zwar an deren in Stellung 7 befindliches N-Atom geknüpft sei. Doch sind wir auch in diesem Punkte vorsichtig gewesen und sagen darüber in den Ber. 41, 3380, 1908, Zeile 15 bis 16:

„das Formelbild der Inosinsäure müßte dann[2]) eine entsprechende Änderung erfahren."

Haiser und Wenzel stellen nun eine neue Inosinsäureformel auf; wie wir wählen sie die Glucosidform der Pentose, wie wir benützen sie die Burianscho Hypothese der Purinverknüpfung in Stellung 7, nur vertauschen sie den Platz von Pentose und Phosphorsäure.[3]) Es braucht

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 696, 1904. — Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 425, 1907.

[2]) Nämlich dann, wenn Burians Ansicht von der Bindung der Purine an die Phosphorsäure im vorliegendem Falle nicht zutrifft. (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 41, 3380, 1908, Zeile 14 bis 15.)

[3]) Sie konstruieren eine Angliederung der Phosphorsäure an die Pentose mittels eines anderen Hydroxyls als in unserem Formelbilde. Daß wir letzteres nie als ein definitives betrachtet wissen wollten, geht außer aus den angeführten Stellen unserer Arbeiten noch daraus hervor, daß wir (Diese Zeitschr. 5, 441, 1907, Zeile 4 u. folg.) ausdrücklich sagen: „Unter Würdigung dieser Tatsachen gelangt man zu etwa folgendem Formelbild für die Inosinsäure . . . . . . Dabei ist selbstverständlich, daß u. a. die Anhydridbildung zwischen Phosphorsäure und der Xylose auch an einer anderen Hydroxylgruppe als der angenommenen vor sich gegangen sein kann."

nicht hervorgehoben zu werden, daß auch diese neue Formel problematisch ist. Die Gesichtspunkte bezüglich Farbenreaktionen und Drehungsänderung bei Substitution, welche die Autoren verwerten, sind recht unsicher.

Zum Schluß möchten wir noch betonen, daß wir uns weder mit der Frage nach der Natur des Carnins bezw. Inosins und dem teilweisen Abbau der Inosinsäure beschäftigt haben, noch uns damit zu befassen gedenken, da ja die partielle Hydrolyse der Nucleinsäuren ein seit langem von anderen Autoren (Kossel, Neumann, Steudel, Schmiedeberg, Mandel, Levene, Bang, Osborne und Harris u. a.) bearbeitetes Gebiet ist. Wir hatten in erster Reihe bezweckt, den stickstoff- und phosphorfreien Teil der Inosinsäure zu charakterisieren. Durch die Feststellung, daß dieser eine optisch aktive Pentose ist, war die Beziehung der Inosinsäure zu den übrigen Nucleinsäuren geklärt. Die sekundäre Frage nach der feineren Struktur der Inosinsäure — so interessant sie ist — erfordert zur Lösung angesichts der schwierigen Beschaffbarkeit genügender Mengen von Inosinsäure unverhältnismäßige Opfer an Zeit und Geld. Da alle unsere tatsächlichen Angaben über die Inosinsäure ihre Bestätigung gefunden haben, schließen wir unsererseits die Diskussion über diesen Gegenstand.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

12. Mitteilung.

Fortgesetzte Beiträge zur Funktion der Milz als Organ des Eisenstoffwechsels.

Von

Richard Zimmermann.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 5. März 1909.)

Einleitung.

So viel über die Beziehungen der Milz zur Blutbildung und Blutzerstörung gearbeitet worden ist, so wenig war über eine wesentliche Grundlage zu dieser Beziehung, falls sie überhaupt existiert, bis vor kurzem bekannt, nämlich über den Zusammenhang zwischen Milz und Eisenstoffwechsel. Nur die Tatsache, daß die Milz zu den Organen gehört, die relativ viel Eisen aufspeichern, war bekannt. Es war daher dringlich, die Frage aufzuwerfen, ob nicht zwischen Milz und Eisenstoffwechsel ein Zusammenhang bestehe.

Den ersten Schritt zu ihrer Lösung tat Großenbacher mit seinen auf Prof. Ashers Anregung und unter dessen Leitung an entmilzten und Normalhunden angestellten Versuchen, die in der vorausgehenden (11. Mitteilung; diese Zeitschr. **17**, 1909) Arbeit mitgeteilt wurden.

Der allgemeine Gang von Großenbachers Versuchen war der folgende.

Er hatte die Ausscheidung des Eisens bei normalen und entmilzten Hunden zu untersuchen.

Als Ausscheidungswege kamen der Harn und der Kot in Betracht.

Nun besitzen die Nieren die Fähigkeit der Eisenausscheidung nur in sehr beschränktem Maße, der Eisengehalt des Harnes ist ein sehr geringer, und selbst nach fortgesetzter interner Eisenzufuhr tritt eine Steigerung der Eisenausscheidung durch den Harn kaum ein. So fand Jacoby auch nach subcutaner und intravenöser Injektion einer neutralen Eisenverbindung nur 2 bis 4 % des eingeführten Eisens im Harn wieder und dies auch erst nach bereits vergiftenden Gaben.

Deshalb untersuchte Großenbacher nur die Faeces von entmilzten und Normalhunden und stellte die Resultate aus den Kotanalysen dieser beiden Versuchsreihen einander gegenüber.

Die Hunde erhielten während der Versuche nur Pferdefleisch in genau abgemessenen Mengen, also eine eisenreiche Nahrung.

Das Ergebnis der Versuche war nun, daß die entmilzten Hunde stets bedeutend mehr Eisen mit ihrem Kote ausschieden, als der Normalhund bei der qualitativ und quantitativ gleichen Nahrung.

Die tägliche Eisenmenge in den Faeces des entmilzten Hundes betrug im Durchschnitt das Doppelte bis Dreifache gegenüber dem Eisengehalte im Kote des Normalhundes.

Während nämlich der Normalhund im Durchschnitt täglich zwischen 6 und 11 mg Fe ausschied, schwankte die tägliche Durchschnittselimination an Eisen im Kote des entmilzten Hundes zwischen 18 und 22 mg Fe.

Gegen diese Versuchsreihe war noch der Einwand möglich, daß die größere Eisenausscheidung des entmilzten Tieres herrührt von einer schlechteren Ausnutzung des Fleisches im Darm infolge der Milzexstirpation.

Um diesen Einwand auszuschließen, hatte Großenbacher noch Versuche angestellt, in denen das Normaltier und das entmilzte hungerten.

Auch hier ergab sich, daß das entmilzte Tier mehr Eisen ausschied als das normale. Auf diese Weise war die Tatsache sehr wahrscheinlich gemacht, daß die Milz ein Organ des Eisenstoffwechsels sei.

Die Erkenntnis von dieser neuen Funktion der Milz gibt aber sofort zu einer Reihe von neuen Fragestellungen Veranlassung.

Der Versuch, diese neuen Fragen zu beanworten, konnte auch dazu dienen, der soeben gewonnenen Erkenntnis neue Stützen zu erwerben, deren sie aus manchen Gründen noch bedarf.

Ich folgte daher der Anregung von Prof. Asher, unter seiner Beihilfe neue Versuche über die Beziehung zwischen Milz und Eisenstoffwechsel anzustellen.

I. Teil.

Die Eisenausscheidung bei subcutaner Injektion von Eisen.

Das erste Problem, welches sich naturgemäß an die Befunde Großenbachers anschloß, war die Frage, wie die Eisenausscheidung bei normalen und entmilzten Tieren sich verhalte, wenn künstlich Eisen zugeführt würde.

Diese Aufgabe erschien um so dringlicher, als Großenbacher schon einen Vorversuch angestellt hatte, der ein sehr auffallendes Resultat lieferte.

Die Eisenausscheidung beim Hund (Normaltier) nach künstlicher Zufuhr von Eisen ist besonders durch die wichtige Arbeit von Gottlieb[1]) genau bekannt. Die von ihm ermittelten Tatsachen konnten daher eine Grundlage bilden, von der meine Versuche ausgingen, und die zum Vergleiche mit der Eisenausscheidung des entmilzten Hundes herangezogen werden mußten.

Die erste Aufgabe bestand nun darin, bei gleicher Ernährung und subcutaner Injektion der gleichen Eisenmenge die Eisenausscheidung von entmilzten und Normalhunden zu vergleichen.

Zur Lösung derselben wurden zwei Serien von Versuchen ausgeführt. In der ersten Serie erhielten die Hunde reine Fleischnahrung, in der zweiten Serie aber eine sehr eisenarme Nahrung. Die Gründe hierfür werden später auseinandergesetzt werden.

---

[1]) Gottlieb, Über die Ausscheidungsverhältnisse des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, Heft 5, 371—386.

Das Eisen wurde auf die Angaben von Gottlieb hin nach dem Vorgehen von Meyer und Williams den Hunden als weinsaures Eisenoxydnatron in schwach alkalischer Lösung eingespritzt.

Der jedesmal als Versuchstier dienende Hund befand sich während des Versuches in einem Glaskäfig, so daß die Faeces mit Eisenteilen nicht in Berührung kommen konnten. Der Kot konnte so quantitativ von der Glasplatte mittels Porzellanspatels in eine Porzellanschale aufgesammelt werden. Für den Fall, daß der Hund Diarrhöe bekam, sammelten sich der Harn und die dünnflüssigen Ausscheidungen in einem Glasgefäß, so daß sie nach Filtration mit für die Analyse verwendet werden konnten.

Während der eigentlichen Versuche trugen die Hunde stets einen Ledermaulkorb, der nur zur Fütterung abgenommen wurde. Die Fütterung habe ich stets selbst vorgenommen, wie ich auch die Nahrung stets selbst abgewogen und zubereitet habe.

Der Kot wurde nach der Methode von Albert Neumann[1]) verascht und das Eisen jodometrisch analysiert.

Großenbacher hat in seiner Arbeit die Neumannsche Methode genau beschrieben nebst den Modifikationen, die sich ihm bewährt hatten. Ich habe genau nach den von Großenbacher gemachten Angaben gearbeitet und kann daher auf eine Wiederholung des analytischen Verfahrens hier verzichten. Nur möchte ich dabei erwähnen, daß ich dem der Filtration vorangehenden Dekantieren der Kolbenflüssigkeit von vornherein das zwar bedeutend langwierigere, aber zuverlässigere Filtrieren vorgezogen habe.

Es sei bemerkt, daß trotz der großen Masse der Faeces stets der ganze Kot, und nicht etwa nur ein beliebiger abgewogener Teil, der Veraschung unterzogen, auf diese Weise also eine Multiplikation eines etwa begangenen Fehlers vermieden wurde.

Wegen der großen Menge des Kotes wurde derselbe je nach seiner Quantität in verschieden viele gleiche Teile geteilt, die dann in einzelnen Kolben getrennt voneinander verascht

---

[1]) Neumann, Einfache Veraschungsmethode (Säuregemischveraschung). Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 115ff. und 43, 32ff.

wurden. In der Regel wurden nie mehr als 6 g Trockenkot in einem Kolben verascht, da unter einer größeren Kotmenge leicht die Sicherheit der Analyse leidet.

Die Versuche begannen mit einer Reihe von drei Hunden, indem dabei zwei entmilzte mit einem Normalhund verglichen wurden.

Es waren dieselben Tiere, die Großenbacher benutzt und welche Prof. Asher im Mai und Juni 1908 entmilzt hatte. Da meine Arbeit in den Monaten Oktober bis Februar angefertigt wurde, so befanden sich die beiden operierten Hunde schließlich im zehnten, bzw. elften Monat nach der Entmilzung. Ich kann im Anschluß an die Mitteilung von Großenbacher erklären, daß die Hunde sich weiter normal entwickelten und in ihrem ganzen Zustande von normalen Tieren keinen Unterschied aufwiesen.

Die Tiere bekamen während der ersten Reihe der Versuche nur Pferdefleisch in genau abgemessenen Mengen, nachdem sie vorher eine Nahrung erhalten hatten, die vorzugsweise aus Hundekuchen, außerdem noch aus Reismehl, Fett- und Gewebeabfällen bestand. Diese Nahrung wurde den Hunden auch sonst außerhalb der Versuche verabreicht.

Ich bemerke gleich hier zu Anfang, daß bei allen angestellten Versuchen stets dieselben Tiere verwendet wurden und diese die Versuche gut überstanden.

Ich berichte zunächst über die erste Reihe der Versuche.

I. Versuchsreihe.

1. Versuch.

Ein entmilzter Hund von 4,950 kg Gewicht bekam vom 1. XI. 1908 bis 7. XI. 1908 als tägliche Nahrung 300 g Pferdefleisch. Er erhielt am 2., 3. und 4. XI. je $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan injiziert. — Dabei sind in $^1/_2$ g Tart. ferrat. = weinsaures Eisenoxydnatrium je 0,115 g Fe enthalten. — Auf diese Weise wurden dem Hunde also 345 mg Fe appliziert. Der Hund befand sich während des ganzen Versuches vollkommen wohl und zeigte stets einen regen Appetit. Man konnte weder Erbrechen noch Durchfall wahrnehmen; auch zeigten sich sonst keine Vergiftungserscheinungen, obwohl der Hund stets immer auf einmal über 100 mg Fe subcutan erhalten hatte. Desgleichen traten keine Abscesse an den Injektionsstellen auf; dieselben heilten reaktionslos.

Der Hund setzte in einer Versuchsperiode von 6 Tagen viermal Kot ab, was als ein sehr günstiges und für die Versuchszwecke sehr

förderliches Verhältnis betrachtet werden muß. Der Kot hatte die bekannten Eigenschaften des Fleischkotes.

Das Ergebnis des Versuches war, daß der entmilzte Hund während der 6 Tage im Durchschnitt täglich 20,31 mg Fe ausschied.

Nehme ich aber, wie die folgende Tabelle zeigt, wegen einer etwaigen Unsicherheit über die Tageszahl, von denen der zuerst erhaltene Kot herrührt, nur den von den drei übrigen Tagen stammenden Kot zur Bildung des Durchschnittes, so resultiert hieraus der Wert von 34,48 mg Eisen.

Die bei der Analyse des Kotes erhaltenen Resultate sind in der hier folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

Datum	Gewicht des Kotes in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
2. XI. mittags	—	—		Injektion von
3. XI.	—	—		je $^1/_2$ g Tart.
4. XI.	24,23	18,43	20,31	ferrat. subcutan
5. XI.	55,12	37,83		
6. XI.	36,14	44,59	34,48	
7. XI.	20,10	21,02		

Der Hund schied also während des Versuches im ganzen 223,13 mg Fe aus, nachdem ihm 345 mg Fe subcutan injiziert worden waren.

Es sind demnach, wenn man die ausgeschiedenen Eisenmengen als Prozente der eingeführten ausdrücken will, im ganzen 64,67 % Fe ausgeschieden worden.

I. Versuchsreihe.

2. Versuch.

Zum Vergleiche mit dem entmilzten Tiere wurde vom 9. bis 16. XI. ein Versuch mit einem Normalhund von 3,650 kg Gewicht unter genau denselben Bedingungen angestellt.

Auch dieser Hund erhielt täglich 300 g Pferdefleisch und am 9., 10. und 11. XI. je $^1/_2$ g Tart. ferrat., also jedesmal 115 mg Fe, zusammen 345 mg Fe subcutan eingespritzt.

Wie der entmilzte, so blieb auch der Normalhund während des Versuches gesund und fraß gut, erbrach sich nicht, bekam keine Diarrhöe, zeigte auch sonst keine Vergiftungssymtome. An den Injektionsstellen traten keine Abscesse auf.

Der großen Kotmassen wegen, ferner um eine möglichst gleichmäßige Teilung des Kotes zu ermöglichen, auch um den Säureverbrauch bei den Analysen zu beschränken und dabei zugleich den Gang der Ver-

aschung zu beschleunigen, wurde von nun an der Kot auf dem Wasserbade und dann im Trockenschrank getrocknet, im Exsiccator abgekühlt, gewogen, in der Reibschale fein zerrieben und dann in möglichst gleichen Teilen in den einzelnen Kolben verascht.

Auf diese Weise stimmten auch die Resultate der einzelnen Kotpartien annähernd miteinander überein.

Dieser letzte Versuch zeigte nun, daß der Normalhund unter den gleichen Fütterungsverhältnissen, und nachdem ihm die gleiche Menge Eisen subcutan beigebracht worden war wie dem entmilzten, dennoch diesem gegenüber mit seinen Faeces bedeutend weniger Eisen ausschied, was die folgende Tabelle ersehen läßt.

Tabelle II.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
9. XI. mittags	—	—	—	7,41	Injektion von je $1/2$ g Tart. ferrat. subcutan
10. XI.	—	—	—		
11. XI.	—	—	—		
12. XI.	—	—	—		
13. XI.	58,35	16,10	30,70		
14. XI.	—	—	—		
15. XI.	—	—	—		
16. XI.	59,60	14,70	21,18		

Also schied der Normalhund während des ganzen Versuches in 30,80 g Trockenkot in allem 51,88 mg Fe, pro die 7,41 mg Fe aus, mithin 15,04 % des eingeführten Eisens, wenn man wieder die ausgeschiedenen Eisenmenge als Prozente der eingeführten ausdrücken will.

Demnach eliminierte der Normalhund dem entmilzten gegenüber innerhalb der Versuchsperiode nur ca. den dritten Teil an Eisen mit seinen Faeces.

Das Ergebnis am Normalhund läßt sich gut kontrollieren durch den Vergleich mit den Zahlen Gottliebs. Dieser Vergleich ist deshalb erwünscht, weil dadurch etwa auftretende Bedenken zerstreut werden, die wegen der nur zweimaligen Kotentleerung in 8 Tagen vielleicht gehegt werden könnten.

Meine hier am Normalhund beobachteten Zahlen für die tägliche Eisenausscheidung entsprechen durchaus den Zahlen Gottliebs, indem sie nur wegen der Fleischnahrung entsprechend höher sind.

Da es sich bei mir um Vergleiche zwischen normalen und entmilzten Hunden handelt, sind meine Perioden von 6 bis 8tägigen Stoffwechselversuchen keine zu kurzen.

I. Versuchsreihe.

3. Versuch.

Um die Resultate aus den Analysen des Kotes vom entmilzten Hunde zu prüfen, wurde noch ein Versuch mit einem anderen milzlosen Hunde von 10,250 kg Gewicht angesetzt. Derselbe dauerte vom 16. XI. bis 23. XI., verlief ohne jeden störenden Zwischenfall und wurde von dem Hunde ebenfalls ohne jede Schädigung seinerseits ertragen.

Entsprechend dem größeren Gewichte des Versuchstieres wurden demselben, statt 300 g Fleisch pro die, 450 g Fleisch täglich gegeben.

Dieser Versuch bestätigte die Richtigkeit der Resultate aus den Analysen des Kotes vom entmilzten Hunde. Auch dieser milzlose Hund zeigte eine tägliche Durchschnittsausscheidung von Eisen mit seinem Kote, der gegenüber die des Normalhundes ebenfalls nur ca. den dritten Teil betrug. Der Hund schied täglich 19,90 mg Fe mit seinen Faeces aus.

Die folgende Tabelle bringt die genaueren Angaben.

Tabelle III.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
16. XI. mittags	—	—	—	19,90	Injektion von je $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan
17. XI.	—	—	—		
18. XI.	—	—	—		
19. XI.	—	—	—		
20. XI.	—	—	—		
21. XI.	—	—	—		
22. XI.	—	—	—		
23. XI.	84,81	33,61	139,31		

Demnach hat der entmilzte Hund während des ganzen Versuches in 33,61 g Trockenkot 139,31 mg Fe ausgeschieden und dieses durch einmaligen Kotabsatz am letzten Versuchstage, mithin 40,35 % des eingeführten Fe.

Sehr interessant ist ein Vergleich der gefundenen Werte für die tägliche Durchschnittsausscheidung von Eisen bei den drei beschriebenen Versuchen mit der von Voit[1]) gefundenen Zahl für das Hungertier.

[1]) Voit, „Physiologie des Gesamtstoffwechsels". Hermanns Handbuch 4, 384.

Voits großer Hund von 35 kg Gewicht schied nämlich im Hunger täglich 21 mg Fe mit seinen Faeces aus.

Demnach hätte der entmilzte Hund von 4,950 kg Gewicht, wenn er noch im Besitze seiner Milz gewesen wäre, unter denselben Verhältnissen wie Voits Hund 2,97 mg Fe pro die ausscheiden müssen. Da er aber in Wirklichkeit 20,31 mg oder nach anderer Rechnung sogar 34,48 mg Fe täglich ausschied, ergibt sich ein Überschuß von 17,34 bzw. 31,51 mg Fe pro die. Nach derselben Vergleichsrechnung hätte der Normalhund von 3,650 kg Gewicht täglich 2,19 mg Fe ausscheiden müssen. Mit seinen 7,41 mg Fe täglich zeigt er aber einen Überschuß von nur 5,22 mg Fe. Dagegen erscheint der von dem 10,250 kg schweren entmilzten Hunde der Voitschen Zahl gegenüber erzielte Überschuß unter den oben erwähnten angenommenen Bedingungen im Vergleich zu dem von dem andern entmilzten Tiere von 4,950 kg Gewicht gelieferten Resultate etwas zu niedrig. Derselbe beträgt nur 13,75 mg Fe pro die.

Bedenkt man jedoch, daß dieser entmilzte Hund von 10,250 kg Gewicht nur einmal, und zwar am letzten Versuchstage Kot absetzte, daß es also ungewiß ist, ob nicht der Hund damit nur einen Teil seiner Faeces entleerte, einen anderen Teil aber vielleicht nach dem Versuch am nächsten Tage oder den darauffolgenden Tagen eliminierte, so läßt sich der etwas zu niedrig erscheinende Wert auf solche Weise wohl erklären.

Die andere Möglichkeit ist aber die, daß künstlich zugeführtes Eisen sehr viel langsamer ausgeschieden wird als das im normalen Stoffwechsel frei werdende. — Freilich hat das Resultat dieses letzten Versuches damit auch etwas von seiner Sicherheit eingebüßt. Immerhin aber zeigt der Versuch doch wiederum die dem Normalhund gegenüber bedeutend höhere Eisenausscheidung des entmilzten Tieres und verdient deshalb sehr wohl, hier angeführt zu werden.

Die Bestätigung dieser schon öfters erörterten Tatsache findet man wiederum in einem Vergleiche des Überschusses in der täglich ausgeschiedenen Eisenmenge beim entmilzten und Normalhund der Voitschen Zahl gegenüber.

Denn der Normalhund bleibt bei diesem Vergleiche mit seinem Plus von nur 5,22 mg Fe pro die beträchtlich hinter den beiden entmilzten zurück, da der eine einen täglichen

Überschuß von 13,75, der andere entmilzte Hund sogar einen solchen von 17,34 bzw. 31,51 mg Fe aufzuweisen hat.

Diese drei Versuche zeigen also, daß ein entmilzter Hund bei gleicher Vorfütterung, gleicher Fütterung während des Versuches und nach subcutaner Applikation der gleichen Eisenmenge dennoch mit seinem Kote ca. dreimal so viel Eisen ausscheidet als ein Normalhund unter denselben Bedingungen.

Betrachtet man nun die Resultate aus den Versuchen von Großenbacher mit reiner Fleischkost und ohne künstliche Einfuhr von Eisen, so ergibt sich eigentlich kein Unterschied gegenüber den drei oben angeführten Versuchen mit künstlicher Einfuhr von Eisen (345 mg) bei reiner Fleischnahrung. Denn dort schwankten die Werte der ausgeschiedenen Eisenmengen zwischen 6 und 11 mg beim normalen und zwischen 18 und 22 mg beim entmilzten Hunde. Wohl aber findet sich ein merklicher Unterschied bei dem ersten Versuche am milzlosen Tier, wenn man die zweite Berechnungsweise pro Tag zugrunde legt.

Bei allen diesen Versuchen, sowohl den von Großenbacher angestellten, als auch den drei oben beschriebenen hatten die Hunde, wie erwähnt, reine Fleischkost, also eine eisenreiche Nahrung erhalten.

Dabei bestand nun für die drei oben angeführten Versuche die Gefahr, daß das mit dem Fleisch eingeführte Eisen die Wirkung des subcutan eingespritzten verdecken, bzw. in den Hintergrund drängen konnte.

Die Tatsache, daß Fleischnahrung ohne Eiseninjektion eine ebenso große Eisenausscheidung machen kann wie mit Eiseninjektion, läßt sich vielleicht daraus erklären, daß das Eisen, welches bei dem Abbau von Fleisch im Organismus frei wird, besonders leicht und rasch ausgeschieden wird.

Nach Voit schied ein großer Hund, der täglich 1500 g Fleisch erhielt, im Tag 81 mg Fe aus. Derselbe Hund eliminierte, als er nur 500 g Fleisch erhielt, täglich mehr als die in diesem Fleische enthaltene Eisenmenge von 27 mg Fe.

Man ersieht daraus, wie große Eisenmengen durch Verzehrung von Fleisch in den Stoffwechsel hineingezogen werden.

Auf diese Weise waren zwei Möglichkeiten geschaffen, was die Mehrausscheidung von Eisen beim entmilzten Hunde an-

geht, die eine, daß das Plus der vom milzlosen Hunde ausgeschiedenen Eisenmengen vom künstlich eingeführten stammte, die andere, daß es seine Quelle in dem mit der Fleischnahrung aufgenommenen Eisen haben konnte.

Es bestand auch die Möglichkeit, daß der wahre Sachverhalt durch eine Kombination der genannten Eventualitäten infolge der Fleischnahrung verdeckt wurde.

Um nun allen diesen genannten Schwierigkeiten aus dem Wege zu gehen und zur Klärung des Sachverhaltes durch eine durchsichtigere Versuchsanordnung beizutragen, wurde zwei Versuchstieren, einem entmilzten und einem Normalhunde, eine möglichst eisenarme Nahrung verabreicht und dabei wiederum Eisen, diesmal je 230 mg, subcutan injiziert.

Dabei zeigten sich die absoluten Eisenwerte etwas geringer, im übrigen war aber das Verhältnis in der Eisenausscheidung zwischen entmilztem und Normalhund dasselbe geblieben, indem auch bei diesen beiden Versuchen der entmilzte Hund dem normalen gegenüber wiederum das zwei- bis dreifache an Eisen täglich ausschied, obwohl doch beide dieselbe eisenarme Nahrung und dieselbe Eisenmenge subcutan injiziert erhalten hatten.

II. Versuchsreihe.

1. Versuch.

Der Versuch mit dem milzlosen Hunde verlief folgendermaßen:

Ein entmilzter Hund von 12,650 kg Gewicht erhielt 7 Tage lang, vom 8. XII. bis 15. XII., eine Nahrung, die ihm pro die nur etwa 1,5 bis 2,0 mg Fe zuführte und die nach den Angaben von Gottlieb hergestellt wurde.

Die tägliche Nahrung des Versuchstieres hatte folgende Zusammensetzung:

Stärkekleister	100 g
Schweineschmalz	50 „
Zucker	50 „
Topfen	50 „

Topfen sind durch Essigsäure aus Milch abgeschiedenes Casein plus Fett.

Ich habe die Fällung der Topfen im Verlaufe der Versuche abgeändert, indem ich anstatt der Essigsäure Labessenz zur Fällung verwandte. Nicht allein wird dadurch das Verfahren der Fällung vereinfacht, sondern es fällt auch der saure Geschmack der Nahrung weg, welchen die nur schwer wegzubringende Essigsäure hinterläßt. Die mit Labessenz zubereitete Nahrung wurde von den Hunden viel gieriger ge-

fressen. So habe ich schließlich auch noch den Zucker zur Geschmackverbesserung hinzugefügt.

Am 8. und 10. XII. erhielt der Hund je $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan injiziert. Der Versuch wurde von dem Hunde gut vertragen. Er fraß sein Futter mit regem Appetit.

Die genauen Zahlen des Versuches bringt die folgende Tabelle.

Tabelle IV.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
8. XII. mittags	—	—	—		Injektion von $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan
9. XII.	—[1])	12,42	27,49		Injektion von $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan
10. XII.	—	—	—		
11. XII.	45,11	10,92	13,09	15,40	
12. XII.	—	—	—		
13. XII.	—	—	—		
14. XII.	61,35	26,12	51,86		
15. XII.	—	—	—		

Also schied der entmilzte Hund innerhalb 6 Tagen in 49,46 g Trockenkot im ganzen 92,44 mg Fe, im Durchschnitt täglich also 15,40 mg Fe, mithin 40,19% der eingespritzten Eisenmenge aus.

Schon aus diesen Zahlen geht hervor, daß die Ausscheidung wegen ihrer Größe bei diesem entmilzten Hunde nicht oder jedenfalls nicht bloß herrühren kann von der Injektion von Eisen.

Denn erstens ist die Ausscheidung wesentlich größer als bei dem Normalhund, der nicht allein subcutane Eiseninjektionen, sondern auch Fleischnahrung erhalten hatte; denn wie Tabelle II gelehrt hat, schied dieser Hund nur 7,41 mg Fe pro Tag aus.

Zweitens sind ja aus Gottliebs Arbeit die Zahlen für die Eisenausscheidung des Normaltieres bei eisenarmer Nahrung bekannt, und diese sind wiederum viel niedriger.

Aus allen diesen Gründen geht aus vorstehendem Versuch erneut hervor, daß die eigentliche Ursache der Mehrausscheidung des Eisens in dem Fehlen der Milz liegt.

Dem soeben besprochenen Versuche am entmilzten Tiere steht der entsprechende Versuch mit einem Normalhunde von 5,200 kg gegenüber.

[1]) Dieses Mal habe ich den Kot aus dem Grunde nicht feucht abgewogen, weil ein Teil so dünnflüssig war, daß derselbe mit Aq. dest. von der Glasplatte in die Porzellanschale gespült werden mußte.

Dieser Hund erhielt als tägliche Nahrung:

Topfen . . . . 50 g
Schweineschmalz . . . . . 50 „
Zucker . . . . 50 „
Stärkekleister . . . . . . 50 „

also eine Nahrung, die zwar 50 g Stärkekleister weniger pro Tag enthielt, aber, verglichen mit dem Gewichte des Hundes, viel voluminöser und nährstoffreicher war als die des entmilzten Tieres von 12,650 kg Gewicht.

Der Versuch dauerte vom 30. XI. bis 8. XII. und wurde von dem Tiere gut überstanden. Am 30. XI. und 5. XII. erhielt der Hund je $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan injiziert.

Die folgende Tabelle enthält die Zusammenstellung der Resultate aus den Kotanalysen.

Tabelle V.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
30. XI. mittags	—	—	—		Injektion von $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan
1. XII.	—	—	—	5,50 (1.–7. XII.)	
2. XII.	—	—	—		
3. XII.	—	—	—		
4. XII.	61,85	20,75	25,86		
5. XII.	—	—	—		Injektion von $^1/_2$ g Tart. ferrat. subcutan
6. XII.	—	—	—		
7. XII.	44,64	13,14	11,66		
8. XII.	—	—	—		

So schied also der Normalhund bei der gleichen Nahrung und der gleichen Menge eingespritzten Eisens in 33,89 g Trockenkot im ganzen 37,52 mg Fe, im Durchschnitt also täglich 5,50 mg Fe aus, mithin 16,31% der eingespritzten Eisenmenge.

Vergleicht man, wie schon bei den drei oben beschriebenen Versuchen geschah, den die tägliche Durchschnittselimination an Eisen im Kote des entmilzten Hundes bezeichnenden Wert, hier also 15,40, mit der schon erwähnten Zahl von Voit, so müßte demnach der entmilzte Hund von 12,65 kg Gewicht, wenn er noch im Besitze seiner Milz wäre, im Hunger 7,58 mg Fe pro die mit seinem Kote ausscheiden.

Da er jedoch 15,40 mg Fe täglich ausschied, so ergibt sich daraus ein Überschuß von 7,82 mg Fe pro die.

Nach dem Vergleiche mit der Voitschen Zahl müßte der Normalhund von 5,200 kg Gewicht im Hunger durchschnittlich 3,12 mg Fe pro die ausscheiden.

Da er aber in Wirklichkeit 5,50 mg Fe täglich ausschied, so erzielte er auf diese Weise einen Überschuß von nur 2,38 mg Fe pro die.

Vergleicht man wie oben den entmilzten Hund mit dem normalen auch in diesem Sinne, mit Bezugnahme auf die Voitsche Zahl, so springt dabei wiederum die viel größere Eisenausscheidung des entmilzten Tieres dem normalen gegenüber ganz deutlich in die Augen. Denn während der Überschuß in der täglichen Eisenausscheidung beim entmilzten Hunde 7,82 mg betrug, blieb der Normalhund mit seinem Plus von nur 2,38 mg Fe um ein beträchtliches hinter dem entmilzten Tiere zurück.

Schon vorher, am 24. XI., war ein Versuch mit einem entmilzten Hunde unter den gleichen Fütterungsverhältnissen und unter Applikation der gleichen Eisenmenge angesetzt worden, mußte aber eines sich bildenden größeren Abscesses wegen nach 4 Tagen abgebrochen werden, weshalb die dabei gewonnenen Resultate nicht in Betracht gezogen werden können, zumal da der Hund infolge des Abscesses geschwächt, die Futteraufnahme unterdrückt und deshalb auch der Stoffwechsel herabgesetzt war.

Trotzdem schied dieser entmilzte Hund von annähernd demselben Gewicht wie das Normaltier doch noch mehr Eisen aus als dieses, nämlich 6,56 mg Fe pro die.

Wir können jetzt im Zusammenhange noch einmal die Tatsachen würdigen, welche der Vergleich der Eisenausscheidung beim normalen und entmilzten Tiere nach künstlicher Zufuhr von Eisen gelehrt hat.

Sowohl bei Fleischnahrung, als auch bei einer eisenarmen Nahrung scheidet der entmilzte Hund mehr Eisen aus als der normale.

Sieht man sich die erhaltenen Zahlen genauer an, so kommt man zu dem bemerkenswerten Resultate, daß die künstliche Zufuhr von Eisen durchaus nicht die Mehrausscheidung des Eisens bei dem entmilzten Tiere in die Höhe treibt.

Dieses Resultat bedarf einer näheren Besprechung.

Der absolute Wert der Eisenausscheidung mindert sich zwar bei eisenarmer Nahrung und subcutaner Eiseninjektion gegenüber eisenreicher Nahrung und Eiseninjektion, aber der Unterschied zwischen der Größe der Eisenausscheidung des normalen und des entmilzten Tieres ändert sich nicht.

Man hätte etwa folgendes erwarten können.

Der normale Hund scheidet bei Fütterung mit eisenarmer Nahrung und subcutaner Injektion von Eisen eine bestimmte Menge Eisen aus. Der entmilzte aber, von dem wir durch Asher und Großenbacher wissen, daß er mehr Eisen ausscheidet als der normale Hund, könnte außer diesem Plus von Eisen noch ein anderes Plus von Eisen ausscheiden, herrührend von der Mehrausscheidung des künstlich zugeführten Eisens.

Wenn der Sachverhalt so gelegen hätte, würde man zu dem Schlusse gekommen sein, daß die Milz einen Teil des künstlich zugeführten Eisens retiniere und daß ihr Fehlen den Verlust eben dieses Teiles bedinge.

Dieser Schluß wird durch die Versuchsresultate unzulässig.

Es muß vielmehr auf Grund der beobachteten Tatsachen behauptet werden, daß die künstliche Zufuhr eines Präparates von weinsaurem Eisenoxyd die an und für sich gegenüber der Norm gesteigerte Eisenausscheidung beim milzlosen Tiere nicht erhöht.

Mit absoluter Gewißheit läßt sich allerdings die Mehrausscheidung des künstlich zugeführten Eisens nicht ausschließen. Es wäre ganz gut denkbar, daß ein Teil der Mehrausscheidung vom künstlich zugeführten Eisen herrühre, und daß statt dessen ein anderes Eisen, welches sonst zur Ausscheidung gelangt, gespart wird.

Aber das, was man beobachten kann, wenigstens unter meinen Versuchsbedingungen, berechtigt zu dieser Annahme nicht.

Hält man sich an die nackten Tatsachen, so kommt man zu der Anschauung, daß die Quelle des mehr ausgeschiedenen Eisens nach der Entmilzung nicht jedes beliebige Eisen sei, sondern ein ganz bestimmtes.

Dieser Anschauung oder Vermutung kann man mit eigens daraufhingerichteten Versuchen näher treten.

II. Teil.

Die Eisenausscheidung bei gesteigertem Zerfall von Zelleiweiß.

In der vorläufigen Mitteilung von Asher[1]) und Großenbacher über die Milz als ein Organ des Eisenstoffwechsels war die Vermutung ausgesprochen worden, daß möglicherweise ein Teil des Eisens, welches nach der Entmilzung dem Organismus verloren geht, dem Stoffwechsel von Körperzellen entstammen könne.

Das nächstliegende wäre ja die Herleitung aus dem Eisen, welches bei der normalen Hämatolyse entsteht.

Aber auch an anderes Eisen mußte gedacht werden, nachdem namentlich durch die Arbeiten von Macallum gezeigt worden ist, daß im Chromatin von allen Zellkernen eine eisenhaltige Substanz vorkommt.

Um diese Idee einer experimentellen Untersuchung zu unterziehen, mußte ein gesteigerter Zerfall von Körperzellen herbeigeführt werden.

Ein derartiger Zerfall kann auf mannigfache Weise bewirkt werden.

Dabei sollte aber, um nicht unübersehbare Verhältnisse zu schaffen, der physiologische Zustand des Tieres möglichst erhalten bleiben.

Bei Anwendung von Giften, durch die man ja einen intensiven Zellzerfall erzielen kann, würde diese Absicht nicht erreicht worden sein.

Anstatt dessen wurde folgender Plan ausgearbeitet.

Es sollte der Zellzerfall dadurch herbeigeführt werden, daß das Tier gezwungen wurde, sein eigenes Gewebe zu verbrauchen, um das für seinen Bestand notwendige Eisen zu erhalten.

Zu diesem Zwecke bekamen die Tiere eine eiweißfreie Nahrung.

Um die Möglichkeit auszuschließen oder zu verringern, daß die Hunde von etwaigem Reserveeiweiß und nicht von ihrem eigenen Zelleiweiß lebten, wurde, ehe der eigentliche

---

[1]) Asher, Centralbl. f. Physiol. 22, Nr. 12, 1908.

Versuch begann, jedes Tier einer Vorperiode unterzogen, in welchem es schon die eiweißfreie Nahrung erhielt.

Diese Vorperiode währte beim Normalhunde 6 Tage, beim entmilzten sogar 10 Tage lang.

Nach den Erfahrungen, welche über die Eiweißentziehung in zahlreichen Stoffwechselversuchen vorliegen, kann man annehmen, daß nach dem zweiten Tage der größte Teil des Vorratseiweißes aufgebraucht ist, und daß von da an das Tier auf Kosten von Eiweiß lebt, welches aus seinem eigenen Körper stammt.

Die nähere Untersuchung der stickstoffhaltigen Endprodukte, die im Harn während einer längeren Periode von Eiweißmangel auftreten, lehrt, worauf besonders Folin aufmerksam gemacht hat, daß diejenigen Stoffe eine große relative Vermehrung erfahren, welche von dem Zerfall von Zelleiweiß herrühren.

Auf Grund dieser Tatsache kann behauptet werden, daß meine Versuchsanordnung, nämlich die längere Fütterung mit eiweißfreier Kost, den beabsichtigten Zweck der Erhöhung des Zerfalls von Körpereiweiß erreicht.

Dieser Zerfall von Körpereiweiß wird zunächst auf Kosten des Muskeleiweiß gehen, und insofern kann man vermuten, daß einigermaßen analoge Verhältnisse vorliegen werden wie bei der Fleischfütterung.

Meine nachfolgenden Versuche bestätigen, wie es scheint, diese hier geäußerte Vermutung.

Leider läßt sich keine bestimmte Aussage darüber machen, wie es sich mit dem Kernzerfall bei Einschmelzung von Körpereiweiß infolge von Eiweißmangel verhält.

Hierüber etwas Bestimmtes zu wissen, wäre sehr erwünscht, weil das eisenhaltige Chromatin seinen Sitz in den Zellkernen hat.

Immerhin gibt es einige für meine Versuchsanordnung nicht unwichtige Angaben in der Literatur.

Voit berechnet, daß ein großer Hund von 35 kg Gewicht 21 mg Fe beim Hunger im Kot abgibt, und er berichtet, daß Bidder und Schmidt bei einer 2,5 kg schweren hungernden Katze 15 mg Fe im täglichen Kot erhielten.

Besonders bemerkenswert ist die weitere Angabe von Voit, daß der Eisenverlust beim Hunger nicht ausschließlich von unterdes zugrunde gegangenen Blutkörperchen abhängt, sondern daß letztere etwa nur den fünften Teil des Verlustes decken.

Um die Hunde auf Eiweißmangel zu bringen, habe ich mich einfach der sehr passenden, von Gottlieb eingeführten Nahrung bedient und darin das Eiweiß weggelassen.

Die Hunde fraßen die Nahrung ganz willig, und ihr Allgemeinbefinden litt nicht darunter. Über die Gewichtsveränderungen gebe ich das Nötige bei den einzelnen Versuchen, zu deren Bericht ich jetzt übergehe.

III. Versuchsreihe.

1. Versuch.

Ein entmilzter Hund wurde vom 30. XII. 1908 bis 9. I. 1909, also 10 Tage lang mit einer Nahrung vorbereitet, die nur aus Schmalz, Zucker und Stärkekleister bestand, also bei genügenden Mengen von Fett und Kohlenhydraten kein Eiweiß enthielt. Am 10. I. setzte der eigentliche Stoffwechselversuch ein und dauerte bis 16. I., also 6 Tage.

Der Hund wog am Anfang des Versuches 14,300 kg.

Die tägliche Nahrung während des Versuches bestand aus

Stärkekleister . . . 75 g,
Zucker . . . . . . 75 g,
Schmalz . . . . . . 75 g,

war also eiweißfrei.

Die folgende Tabelle bringt die Resultate der einzelnen Kotanalysen.

Tabelle VI.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
10. I. mittags	138,65	38,03	23,89		
11. I.	116,98	33,51	23,41	19,63 (11.–16. I.)	
12. I.	53,53	17,73	19,36		
13. I.	—	—	—		
14. I.	37,59	14,66	25,06		
15. I.	51,18	21,67	31,87		
16. I.	29,39	9,77	18,09		

Da man nicht wissen kann, von wieviel Tagen vor der ersten Kotausscheidung am 10. I. sich die Faeces im Darm des Tieres angehäuft haben, und rechnet man infolgedessen das an diesem Tage eliminierte Eisen nicht mit in den Versuch hinein, so schied der entmilzte Hund in 97,34 g Trockenkot im ganzen 117,79 mg Fe, also im Durchschnitt täglich 19,63 mg Fe aus.

Er wog am Anfang des Versuches 14,300 kg,
am Ende desselben . . . . 13,450 kg,
setzte also . . . . 0,850 kg

während des Versuches von seiner Körpersubstanz zu.

Die hier verzeichnete Abnahme des Körpergewichtes bei gleichzeitiger genügender Ernährung mit stickstofffreien Nahrungsmitteln beweist, daß es gelungen ist, Körpersubstanz in erheblichem Umfange zur Einschmelzung zu bringen.

Was die Eisenausscheidung anbetrifft, so werde ich sie im Zusammenhange besprechen, nachdem ich den Versuch berichtet habe, der am normalen Hunde angestellt wurde.

III. Versuchsreihe.

2. Versuch.

Hier folgt der entsprechende Versuch mit dem Normaltiere.

Dieser Normalhund wurde 6 Tage, vom 30. XII. 1908 bis 4. I. 1909, mit einer eiweißfreien Nahrung vorbereitet und trat am 5. I. mit einem Gewicht von 5,700 kg in den eigentlichen Stoffwechselversuch ein.

Der Versuch dauerte 15 Tage, bis 20. I. 1909.

Die tägliche Nahrung des Hundes bestand aus

Stärkekleister . . . 50 g,
Zucker . . . . . . 50 g,
Schmalz . . . . . . 50 g,

war also auch eiweißfrei.

Die Resultate aus den einzelnen Kotanalysen sind hier tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle VII.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
5. I. mittags	—	—	—		
6. I.	—	—	—		
7. I.	—	—	—		
8. I.	—	—	—		
9. I.	—	—	—		
10. I.	—	—	—		
11. I.	36,10	13,60	27,88		
12. I.	—	—	—		
13. I.	12,31	2,50	4,11	6,12	
14. I.	6,55	3,02	6,93		
15. I.	—	—	—		
16. I.	30,18	11,29	32,22		
17. I.	—	—	—		
18. I.	—	—	—		
19. I.	10,26	5,50	5,03		
20. I.	10,65	4,25	15,70		

Demnach schied der Normalhund während der 15 Tage in 40,16 g Trockenkot im ganzen 91,87 mg Fe, also im Durchschnitt täglich 6,12 mg Fe aus.

Er wog am Anfang des Versuches 5,700 kg,
am Ende desselben . . . . . 5,350 kg,
büßte infolgedessen . . . . . 0,350 kg

während des Versuches von seiner Körpersubstanz ein, ein Zeichen dafür, daß auch beim Normalhund eine Steigerung des Zerfalls von Körpereiweiß gelang.

Nun schied, wie schon erwähnt, Voits großer Hund von 35 kg Gewicht im Hunger täglich 21 mg Fe aus.

Demnach müßte mein entmilzter Hund von 14,300 kg, wenn er noch im Besitze seiner Milz wäre, unter den gleichen Verhältnissen 8,57 mg Fe im Durchschnitt täglich ausscheiden.

Er schied aber in Wahrheit 19,63 mg Fe pro die aus, nachdem er zwar nicht gehungert, aber eine eiweißfreie Nahrung erhalten hatte, die ihn zwang, ähnlich dem hungernden Hunde von Voit, von seiner Körpersubstanz abzubauen.

Der entmilzte Hund eliminierte demnach einen täglichen Überschuß von 11,06 mg Fe mit seinen Faeces gegenüber der täglichen Eisenausscheidung bei dem Hungertiere von Voit.

Dasselbe auf den Normalhund von 5,700 kg Gewicht angewandt, müßte dieser nach der Voitschen Zahl 3,42 mg Fe täglich ausscheiden.

Nachdem er zwar nicht gehungert, aber infolge des Eiweißmangels seiner Nahrung ähnlich dem Hunde von Voit von seiner Körpersubstanz gelebt hatte, schied er jedoch 6,12 mg Fe pro die aus.

Demnach beträgt der tägliche Überschuß an Eisen im Kote des Normalhundes nur 2,70 mg.

Vergleicht man nun wiederum den entmilzten Hund mit dem normalen in diesem Sinne mit Bezugnahme auf die Voitsche Zahl, so bestätigt sich auch hier die Tatsache von der größeren Eisenausscheidung des entmilzten Hundes gegenüber dem normalen, indem der Überschuß in der täglich ausgeschiedenen Eisenmenge sich bei diesem auf nur 2,70 mg, bei jenem aber auf 11,06 mg beläuft.

Wie alle diese Ausführungen und die Tabellen lehren, betrug also bei dem Normalhund bei derselben eisenarmen Nahrung,

wie sie ihm im vorhergehenden Versuche gegeben wurde, nur daß hier das Eiweiß fehlte, und ohne daß ihm künstlich Eisen zugeführt wurde, die tägliche Durchschnittsausscheidung an Eisen mehr, nämlich 6,12 mg, als sie bei demselben Hunde betragen hatte, während ihm bei gleicher Nahrung + Eiweiß noch 230 mg Fe subcutan injiziert worden waren, nämlich 5,15 mg Fe.

Ja, die Zahl 6,12 erreicht fast den Wert 7,41, den derselbe Hund lieferte, als man ihm bei reiner Fleischnahrung noch 345 mg Fe subcutan beibrachte.

Dasselbe zeigt der Versuch mit dem entmilzten Hunde.

Während ihm bei eiweißhaltiger eisenarmer Nahrung 230 mg Fe subcutan eingespritzt wurden, schied er im Durchschnitt täglich nur 15,40 mg Fe aus; dagegen betrug bei derselben eisenarmen Nahrung minus Eiweiß seine tägliche Durchschnittsausscheidung an Eisen 19,63 mg, obwohl die künstliche Eisenzufuhr völlig ausblieb.

Nun schied nach Tabelle III derselbe entmilzte Hund bei reiner Fleischnahrung und subcutaner Injektion von 345 mg Fe im Durchschnitt täglich 19,90 mg Fe aus, so daß dieser Wert hinter dem oben genannten von 19,63 sogar noch an Größe zurückzubleiben scheint.

Freilich darf man, wie oben bei Tabelle III erwähnt wurde, nicht vergessen, daß der entmilzte Hund damals während des ganzen Versuchs nur einmal Kot absetze, und zwar am letzten Versuchstage.

Dabei besteht also die Möglichkeit, daß nur ein Teil des Eisens zur Ausscheidung kam, ein anderer aber für den Versuch verloren ging, also der Wert 19,90 wohl etwas zu niedrig ist und sicher um ein geringes die Zahl 19,63 überragen wird.

Die andere Möglichkeit ist aber die, daß künstlich zugeführtes Eisen sehr viel langsamer ausgeschieden wird als das im normalen Stoffwechsel frei werdende.

Und alles, was wir über die Eisenausscheidung nach künstlicher Zufuhr von Eisen wissen, spricht mehr für diese Möglichkeit.

Es sei gleich hier bemerkt, daß eine Nachwirkung der früheren Eiseninjektionen auf die letzten beiden Versuche ohne Eisenapplikation ausgeschlossen ist, da von der letzten Eisen-

injektion bis zum Anfang der Versuche **ohne** Verabreichung von Eisen bei dem entmilzten Hunde 26 Tage (10. XII. bis 5. I.), beim Normaltier sogar 31 Tage (5. XII. bis 5. I.) vergangen waren.

Es ist leicht zu verstehen, daß die oben angegebenen Resultate aus den Versuchen mit eiweißfreier Nahrung **ohne** Eiseninjektion wegen ihrer Größe sehr bemerkenswert sind, und deshalb eine weitere Kontrolle sehr erwünscht erscheint.

Denn bei einem Vergleiche derselben mit den Durchschnittszahlen aus den Versuchen mit reiner Fleischnahrung + Eiseninjektion und mit denen aus den Versuchen mit eiweißhaltiger eisenarmer Nahrung + Eiseninjektion scheinen jene Werte offenbar hoch zu sein.

Um nun weitere Erfahrungen über die eigentümlichen Verhältnisse bei Zerfall von Körpereiweiß zu gewinnen, wurden Kontrollversuche derart angestellt, daß ein Normalhund unter denselben, ein entmilzter (derselbe wie oben) unter ähnlichen, von der einen zu der anderen Versuchreihe gewissermaßen hinüberleitenden Versuchsanordnungen auf ihre tägliche Durchschnittsausscheidung an Eisen geprüft wurden.

IV. Versuchsreihe.

1. Versuch.

Ich lasse hier den Versuch mit dem Normalhunde folgen.

Ein Normalhund von 6,500 kg Gewicht, der also etwa ebenso schwer war wie das zu dem oben beschriebenen Versuch verwendete Normaltier, erhielt die gleiche Nahrung wie dieses, nämlich:

Stärkekleister . . . 50 g,
Zucker . . . . . . 50 g,
Schmalz . . . . . . 50 g,

also eine eiweißfreie Kost.

Der Versuch verlief ohne jeden störenden Zwischenfall. Der Hund fraß sein Futter mit gutem Appetit und zeigte sich auch sonst wohl, ja, er nahm sogar noch 0,250 kg während des Versuches zu; denn am

Anfang des Versuches wog er 6,500 kg,
und am Ende desselben . . . 6,750 kg.

Hier trat trotz des fehlenden Eiweißes eine geringe Zunahme des Körpergewichtes ein. Es ist klar, daß diese Zunahme, wenn sie nicht eine scheinbare durch Wasserretention ist, auf Fettansatz zu beziehen ist. Die beiden zu diesen zwei Versuchen verwendeten Tiere hatten auch ein gut entwickeltes Fettpolster.

Der Versuch dauerte vom 4. bis 10. II., also 6 Tage.

Die folgende Tabelle bringt die Resultate aus den Kotanalysen.

Tabelle VIII.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	Gewicht des Kotes getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
5. II. mittags	—	—	—		
6. II.	76,35	34,06	29,85		
7. II.	—	—	—	8,71 (7.–10. II.)	
8. II.	—	—	—		
9. II.	27,07	10,54	10,80		
10. II.	46,25	16,95	24,05		

Da dieser Normalhund keine bestimmte eisenarme eiweißfreie Vorfütterung, sondern wie schon eingangs erwähnt, die zumeist aus Hundekuchen und Reismehl bestehende Nahrung erhalten hatte, und da man zudem nicht weiß, von wieviel Tagen sich der Kot vor der ersten Ausscheidung während des Versuches im Darm des Tieres angehäuft hat, so läßt man im Interesse der Genauigkeit des Resultates die Rechnung erst am 7. II. beginnen, also an dem auf die erste Kotentleerung folgenden Tage.

Nach dieser Korrektur hat der Normalhund in 27,49 g Trockenkot im ganzen 34,85 mg Fe, also bei der in Betracht kommenden 4 tägigen Versuchsperiode im Durchschnitt 8,71 mg Fe pro die, ausgeschieden.

IV. Versuchsreihe.

2. Versuch.

Um die Resultate aus den Analysen des Kotes vom entmilzten Hunde zu prüfen, wurde derselbe Hund noch einmal zu einem Versuche herangezogen, der zwar nicht, wie schon erwähnt, unter genau den gleichen Fütterungsverhältnissen stand, der aber das Tier in ähnliche Verhältnisse wie dort zwang, indem die Nahrung wohl Eiweiß enthielt, dasselbe aber für den unterdessen schwerer gewordenen Hund von 16,550 kg Gewicht durchaus unzulänglich war. Die Eiweißmenge war um so weniger zureichend, als ich absichtlich die Menge von stickstofffreien Nährstoffen herabminderte. Die kleine Menge Topfen habe ich gereicht, weil es mir schien, als ob diese die Defäkation erleichterten.

Demnach mußte der Hund ähnlich wie bei dem Versuch mit gänzlichem Mangel an Eiweiß wieder von seinem eigenen Körpereiweiß abbauen.

Daß der Hund trotzdem während des Versuches an Gewicht noch zunahm, rührt wieder daher, daß er Fett aufspeicherte, und ist bei der Verabreichung von Schmalz und Kohlenhydraten mit der Nahrung wohl zu erklären.

Der Hund wog nämlich am Anfang des Versuches 16,550 kg,
und am Ende desselben . . . . 16,750 kg,
nahm also um . . . . 0,200 kg
während des Versuches zu.

Die Gewichtszunahme von 0,2 kg kann natürlich auch eine nur scheinbare sein.

Die Nahrung bestand aus

Stärkekleister . . . 50 g,
Zucker . . . . . . 50 g,
Schmalz . . . . . . 50 g,
Eiweiß nur ca. . . . 20 g.

Die genaueren Angaben der Resultate aus den Analysen des Kotes bringt die folgende Tabelle.

Tabelle IX.

Datum	Gewicht des Kotes in g		Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
	feucht	getrockn.			
4. II. mittags	—	—	—		
5. II.	86,57	26,92	29,30		
6. II.	56,16	20,35	27,30	22,19	
7. II.	—	—	—		
8. II.	36,38	13,15	26,51		
9. II.	—	—	—		
10. II.	—	—	—		
11. II.	40,04	16,03	41,21		
	28,63	9,94	38,16		Der Hund setzte nämlich am 11. II. zweimal, morgens u. abends, Kot ab.

Läßt man wiederum aus schon erwähnten Gründen die Rechnung erst mit dem 6. II., also mit dem auf die erste Kotentleerung folgenden Tage beginnen, so schied der Normalhund in dieser Versuchsanordnung in 59,47 g Trockenkot im ganzen 133,18 mg Fe aus, im Durchschnitt täglich also 22,19 mg Fe, gegenüber 19,63 mg in dem zu kontrollierenden Versuch bei völligem Eiweißmangel, so daß also die Zahl 19,63 als Ausdruck für die tägliche Durchschnittsausscheidung an Eisen in mg im Kote des entmilzten Hundes bei eiweißfreier Nahrung hinlänglich die Bestätigung ihrer Richtigkeit erfährt.

So bewies auch beim Normalhund der Kontrollversuch, daß das vom ersten Normaltier gelieferte Resultat richtig war,

da sich die den Durchschnittsgehalt an Eisen in mg im Kote des 5,700 kg schweren Normalhundes bezeichnende Zahl 6,12 mit dem entsprechenden Werte des Kontrolltieres von 6,500 kg Gewicht in Höhe von 8,71 zur Genüge deckt.

Zieht man hier wiederum die Voitsche Zahl zum Vergleiche heran, so müßte der entmilzte Hund von 16,550 kg Gewicht, wenn er noch im Besitze seiner Milz wäre, im Durchschnitt täglich 9,92 mg Fe im Hunger ausscheiden.

Da er aber in Wahrheit bei dem obenstehenden Versuche 22,19 mg Fe ausschied, so erzielte er damit einen Überschuß von 12,27 mg Fe pro die.

Nach der Voitschen Zahl hätte der Normalhund von 6,500 kg unter den gleichen Verhältnissen wie Voits Versuchstier im Durchschnitt täglich 3,90 mg Fe auszuscheiden.

Der Versuch zeigte aber eine tägliche Durchschnittselimination von 8,71 mg Fe.

Demnach beträgt der tägliche Überschuß in der Eisenausscheidung des Normalhundes nur 4,81 mg, ein Wert, der hinter dem Überschuß von 12,27 mg Eisen pro die seitens des entmilzten Hundes doch um ein beträchtliches zurückbleibt, wieder ein Beweis dafür, daß die Eisenausscheidung des entmilzten Tieres die des Normaltieres unter etwa den gleichen Bedingungen immer wieder ganz bedeutend überwiegt.

Nach den beschriebenen Versuchen kommt alsdann der eine Faktor, nämlich das künstlich eingeführte Eisen, als Quelle für das Plus der Eisenausscheidung beim entmilzten Hunde in Wegfall.

Nach dem Vergleiche der beiden Versuche mit eisenarmer eiweißhaltiger Nahrung und künstlicher Eiseninjektion mit denen ohne Eisenapplikation bei derselben eisenarmen Nahrung ohne Eiweiß hat das künstlich eingeführte Eisen, wie es wenigstens scheint, sogar keinen Einfluß auf die Höhe der Eisenausscheidung überhaupt, sowohl beim entmilzten Hunde als auch beim Normaltier.

Dagegen scheinen die drei ersten Versuche mit der reinen Fleisch-, also eisenreicher Nahrung, und Eiseninjektion diese letzte Frage offen zu lassen, zumal da auch Großenbacher nach Applikation von Eisen als Ferr. sacchar. per os bei reiner Fleischnahrung eine kleine Steigerung der Eisenausfuhr in

gleicher Weise sowohl beim entmilzten als beim Normalhund beobachtet hatte.

Was nun die Höhe der Eisenausscheidung überhaupt, sowie das Verhältnis derselben beim entmilzten Hunde gegenüber der des Normaltieres angeht, so blieb es den Tieren gleich, ob sie mit ihrer eisenarmen Nahrung noch Eiweiß erhielten oder nicht. Im letzteren Falle nahmen sie eben von ihrer eigenen Körpersubstanz und glichen den Mangel durch erhöhten Zellzerfall aus.

Diese Tatsache deuteten auch schon die von Großenbacher angestellten Hungerversuche an. Jedoch konnten diese leicht täuschen, da die Tiere einmal mit keiner eiweißfreien Nahrung vorbereitet waren, sondern bis zum ersten Versuchstage reine Fleischkost erhalten hatten, und da zweitens die Versuche zu kurze Zeit (höchstens drei Tage) dauerten, so daß also die Nachwirkung der vorher gereichten Fleischkost den eigentlichen Hungerversuch überdauerte.

Die Versuche ergeben also, daß der experimentell herbeigeführte Zerfall von Körpereiweiß sowohl beim Normaltier wie beim entmilzten die Eisenausscheidung durch den Kot in die Höhe treibt.

Die Steigerung ist größer als bei künstlicher Zufuhr von Eisenpräparaten und als bei reiner Fleischfütterung.

Die geringere Eisenausscheidung im ersteren Falle erklärt sich zur Genüge aus der schon mehrfach betonten langsamen Ausfuhr dieses Eisens.

Die geringere Ausscheidung von Eisen bei Fleischnahrung gegenüber derjenigen bei gesteigertem Zerfall von Körpereiweiß erklärt sich aus der Verschiedenheit des Materials, welches zum Zerfall kommt.

Diese Verschiedenheit ergibt sich z. B. aus dem Unterschied in der Zusammensetzung des Harns an stickstoffhaltigen Bestandteilen in beiden Fällen.

Verschieden aber ist auch der Eisengehalt des Kotes; deshalb muß man annehmen, daß beim Zerfall von Körpereiweiß mehr Eisen mobilisiert wird.

Bei weitem das bemerkenswerteste Resultat ist aber die große Mehrausscheidung des entmilzten Tieres.

Das Ergebnis spricht sehr dafür, daß die oben von mir

zitierte Annahme von Asher, die Milz verarbeite vornehmlich ein aus dem Zerfall von Körpermaterial frei werdendes Eisen, zutrifft.

Fehlt die Milz, so muß es daher zu einem Verlust von diesem Teil des Eisens kommen.

Es muß späterer Forschung vorbehalten werden, weitere Grundlagen für diese Anschauung zu gewinnen.

III. Teil.

Die Eisenausscheidung bei Applikation von Pyrodin (subcutan und per os).

Im II. Teil meiner Arbeit war erwähnt worden, daß nach Voit der Eisenverlust des Organismus etwa zum fünften Teil von unterdes zugrunde gegangenen Blutkörperchen gedeckt werde.

Auch wurde oben schon darauf hingewiesen, daß ebenso ein Teil des Eisens, das nach der Entmilzung dem Körper verloren geht, der normalen Hämatolyse entstammen könnte.

Um nun zu sehen, wie weit das Eisen des Hämoglobins nach der Entmilzung des Tieres in den Eisenstoffwechsel des Körpers eingreift, müßten Versuche angestellt werden, bei denen die Hämatolyse gesteigert, zugleich aber ein Zerfall von anderem Zelleiweiß unnötig gemacht, bzw. verhindert werden könnte.

Während man aber den Zerfall von Zelleiweiß im Gewebe einfach dadurch steigern konnte, daß man den Hunden eine eiweißfreie Nahrung gab, sie also zwang, auf Kosten ihrer Körpersubstanz zu leben, und so ohne Anwendung von Giften, durch die man ja einen sehr regen Zerfall von Zelleiweiß erreichen kann, die Tiere möglichst in ihrem physiologischen Zustande erhielt, konnte man eine Steigerung der Hämatolyse nur durch ein Gewaltmittel, durch Anwendung eines Blutgiftes erreichen.

Dieses Blutgift ist aber auch zugleich ein allgemeines Zellgift, so daß es sich bei Anwendung eines der zur Verfügung stehenden Blutgifte nicht nur um eine bloße Steigerung der Hämatolyse, sondern zugleich um einen vermehrten Zerfall von Zelleiweiß im Gewebe handeln kann.

Aber man kann doch behaupten, daß die Hämolyse im Vordergrund steht, namentlich was die Freimachung von Eisen anbetrifft.

Nun besitzt nach Pugliese[1]), Luzzatti u. a. neben Toluilendiamin das Pyrodin = Acetylphenylhydrazin (C_6H_5. NH . NH . C_2H_3O) die Fähigkeit der Hämatolyse in hohem Grade.

Die Anwendung dieses Mittels erschien schon aus dem Grunde erwünscht, weil die beiden genannten Autoren dasselbe in seiner Wirkung auf entmilzte und Normalhunde geprüft haben, zumal da sie vom Toluilendiamin am Schlusse ihrer Betrachtung über dieses Mittel sagen: „En conséquence, nous maintenons fermement notre conclusion que, chez le chien, la toluilendiamine n'est pas un poison spécifique du sang."

Bei Anwendung von Pyrodin machten nun Pugliese und Luzzatti die interessante Beobachtung, daß entmilzte Hunde Dosen von Pyrodin vertrugen, die bei denselben Hunden vor ihrer Entmilzung die schwersten Vergiftungssymptome erzeugt hatten. Ja, die Dosen konnten bei den entmilzten Hunden sogar noch beträchtlich gesteigert werden, ohne irgendwelche schwereren Vergiftungssymptome hervorzurufen.

„Tandis que les chiens normaux réagirent fortement au poison lorsque la destruction sanguine fut considérable, les mêmes chiens privés de la rate, ne présentèrent pas de phénomènes morbides importants, même après des doses très élevées de poison, si l'on excepte l'extrême pâleur des muqueuses visibles, laquelle était précisément en rapport avec la forte déglobulisation.

Les chiens sans rate présentèrent donc une tolérance extraordinaire envers le poison hématique, malgré la forte destruction sanguine."

Was die Blutveränderung angeht, so haben außer Pugliese und Luzzatti früher auch schon andere Autoren (Mosler, Schindeler, Malassez, Winogradow, Vulpius, Laudenbach, Michelozzi) diese Erscheinung nach Milzexstirpation beobachtet derart, daß nach der Splenektomie die roten Blutkörperchen und das Hämoglobin eine Verminderung, die Leukocyten dagegen eine Vermehrung erfahren.

Wie hoch Pugliese und Luzzatti die Pyrodindosis steigern mußten, um bei einem entmilzten Hunde die Erscheinungen einer allgemeinen Pyrodinvergiftung hervorzurufen, zeigt folgender Fall: „Pour avoir des effets toxiques mortels, on dut

---

[1]) Pugliese u. Luzzatti, Arch. ital. de Biol. 33, fasc. 3.

administrer à un petit chien de kg 7, deux doses de pyrodine d'un demi-gramme chacune, doses si extraordinairement élevées que les phénomènes d'intoxication générale durent nécessairement prédominer."

Da es sich aber bei meinen Versuchen nicht darum handelte, an den Tieren die Erscheinungen einer schweren Pyrodinintoxikation auszulösen, sondern nur die sicheren Anzeichen einer gesteigerten Hämolyse hervorzurufen, wurde den Hunden das Präparat in Dosen von nur 0,1 g, und zwar zweimal subcutan und einmal per os, beigebracht, so daß also die Tiere im ganzen 0,3 g Pyrodin erhielten.

Um nun die Frage nach dem Plus, das der entmilzte Hund in der Eisenausscheidung dem normalen gegenüber zeigt, bei gesteigerter Hämatolyse zu beleuchten, wurden zwei Versuche angestellt, indem dabei ein entmilzter Hund mit einem Normaltier von annähernd gleichem Gewicht verglichen wurde.

V. Versuchsreihe.

1. Versuch.

Ich lasse hier den Versuch mit dem entmilzten Hunde folgen.

Ein entmilzter Hund von 6,960 kg Gewicht erhält vom 20. bis 25. I. als Vorfütterung die im allgemeinen nach Gottlieb hergestellte Nahrung von der Zusammensetzung

Topfen	50 g
Zucker	25 „
Schmalz	25 „
Stärkekleister . . .	25 „

Damit trat das Tier mit einer eisenarmen Kost in den Versuch ein, die zudem so viel Eiweiß besaß, daß die Ernährung des Tieres zum mindesten eine Steigerung des Zerfalls von Zelleiweiß im Gewebe unnötig machte.

Diese Nahrung wurde dem Tiere auch während des Versuchs täglich gegeben.

Derselbe dauerte vom 25. bis 30. I., also 5 Tage.

Am 25. I. erhielt der Hund 0,1 g Pyrodin subcutan injiziert.

Diese Dosis wurde den Tieren immer in 5 ccm Aq. dest. und 5 ccm Spirit. gelöst eingespritzt.

Am 26. I. hatte der Hund sein Futter vollständig verzehrt und zeigte sich auch sonst völlig wohl, nur waren die sichtbaren Kopfschleimhäute leicht anämisch. Es wurde ihm eine geringe Menge Blut entnommen, um darin die roten Blutkörperchen auf ihre Gestalt und Größe

hin zu prüfen, sowie nach etwa vorhandenen Zerfallsprodukten derselben zu suchen. Von letzteren konnte man jedoch ebensowenig etwas entdecken, wie die Blutkörperchen gegenüber denen des Normaltieres, bei dem derselbe Versuch zu gleicher Zeit ausgeführt wurde, an Größe und Gestalt etwas Bemerkenswertes aufwiesen. Sie waren nur in der Untersuchungsflüssigkeit (0,9%ige Kochsalzlösung) geschrumpft und hatten so ihre bekannte „Stechapfelform" angenommen. Der in einem Glasgefäß aufgefangene Harn hatte eine normale Farbe. Er wurde spektroskopisch untersucht; es ergab sich aber bei seiner Prüfung auf Hämoglobin ein negatives Resultat.

Daraufhin erhielt der Hund am 27. I. wiederum 0,1 g Pyrodin subcutan eingespritzt. Auch an diesem Tage konnte man weder an den Blutkörperchen noch am Urin einen Unterschied gegenüber dem Befunde am Tage vorher bemerken. Ebenso fühlte sich das Tier vollkommen wohl und fraß sein Futter mit regem Appetit. Die Anämie der Kopfschleimhäute war jedoch deutlicher als am vorhergehenden Tage.

Nachdem auf diese Weise die subcutane Injektion von zusammen 0,2 g Acetylphenylhydrazin keine hervortretenden Erscheinungen eine Pyrodinwirkung gezeitigt hatte, wurde dem Hunde am 28. I. 0,1 g Pyrodin per os mit dem Futter gegeben, um gleichzeitig zu sehen, wie das Präparat vom Darme aus wirke.

Auch an diesem Tage zeigten die Blutkörperchen nichts Bemerkenswertes gegenüber denen des Normalhundes. Dagegen trug der Harn schon bei bloßer Betrachtung den Charakter des ikterischen. Es wurde Gmelins und Pettenkofers Reaktion gemacht. Beide bewiesen die Gegenwart von Gallenfarbstoffen und Gallensäuren im Harn des entmilzten Hundes.

Die am folgenden Tage, am 29. I. vorgenommene Harnuntersuchung zeigte den Befund vom 28. I. in abgeschwächtem Grade, indem die beiden genannten Reaktionen die Gegenwart von Gallenfarbstoffen und Gallensäuren im Harn eben nur noch anzudeuten vermochten. An diesem Tage, am 29. I., also einen Tag nach der Verabreichung von 0,1 g Pyrodin per os, fraß der Hund sein Futter nur zum Teil und zeigte sich auch sonst etwas benommen. Die Blässe der sichtbaren Kopfschleimhäute bestand fort.

Das ihm am nächsten Tage, 30. I., gereichte Futter rührte er nicht an, was den Schluß zuläßt, daß sich das Tier infolge der Verabreichung des Pyrodins per os eine Magenverstimmung zugezogen haben muß.

Auf diese Weise hatte also der Hund, abgesehen von der geringen Alteration des Magens, den Versuch gut überstanden, Die Injektionsstellen waren geheilt, ohne daß sich an ihnen Abscesse gebildet hatten.

Die folgende Tabelle bringt die Resultate aus den Kotanalysen.

Tabelle X.

Datum	Gewicht des Kotes feucht in g	getrockn. in g	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
25. I. mittags	—	—	—		Injektion von 0,1 g Pyrodin subcutan
26. I.	54,19	20,41	25,16	13,19	
27. I.	—	—	—		Injektion von 0,1 g Pyrodin subcutan
28. I.	—	—	—		0,1 g Pyrodin per os
29. I.	26,28	11,38	33,53	10,20	
30. I.	17,19	5,33	7,28		

Demnach schied der entmilzte Hund in 37.12 g Trockenkot im ganzen 65,97 mg Fe, im Durchschnitt täglich also 13,19 mg Fe aus.

Bedenkt man aber, daß sich der Kot schon von einer Reihe von Tagen vor der ersten Ausscheidung während des Versuches im Darm des Tieres angehäuft haben kann und rechnet man den Versuch infolgedessen erst von dem auf die erste Kotausscheidung folgenden Tage an, so hat alsdann der entmilzte Hund in 16,71 g Trockenkot im ganzen 40,81 mg Fe, im Durchschnitt also täglich 10,20 mg Eisen ausgeschieden.

Der Hund wog

am Anfang des Versuches . . . . 6,960 kg
am Ende desselben . . . . 6,630 „
verlor also . . . . 0,330 „

während des Versuches von seinem Körpergewicht.

V. Versuchsreihe.

2. Versuch.

Dem Versuche mit dem entmilzten Hunde gegenüber steht der mit einem Normaltier.

Ein Normalhund von 5,640 g Gewicht erhielt vom 20. bis 25. I. als Vorfütterung eine Nahrung, die genau so zusammengesetzt war wie die des entmilzten Hundes, die also bestand aus

Topfen . . . . . . 50 g
Zucker . . . . . . 25 „
Schmalz . . . . . 25 „
Stärkekleister. . . 25 „

Auf diese Weise traten beide Tiere, der entmilzte und der Normalhund, etwa in dem gleichen Zustande in den Versuch ein.

Der Versuch mit dem Normalhund begann ebenfalls am 25. I. und endete am 29. I., dauerte also vier Tage.

Am 25. I. erhielt der Hund 0,1 g Pyrodin, wie beim entmilzten Hunde in 5 ccm Aq. dest. und 5 ccm Spirit. gelöst, subcutan eingespritzt.

Die am 26. I. vorgenommene Untersuchung des Blutes auf die Größe und Gestalt der roten Blutkörperchen und auf den Vergleich mit denen des entmilzten Hundes hin ergab, wie bei diesem schon erwähnt wurde, keinen Unterschied dem milzlosen Tiere gegenüber. Der Harn war auch hier normal. Nur machte sich hier wie dort die Anämie der sichtbaren Kopfschleimhäute bemerkbar. Der Zustand des Tieres war aber sonst zufriedenstellend; es entwickelte einen regen Appetit.

Am 27. I. hatte die Blutuntersuchung dasselbe Resultat wie am Tage vorher. Auch die spektroskopische Untersuchung des Harnes auf Hämoglobin hatte ein negatives Ergebnis. Das Tier befand sich wohl und fraß gut. Die Blässe der Kopfschleimhäute war geblieben.

Da die Wirkung des Pyrodins auf diese Weise auszubleiben oder doch nur sehr schwach angedeutet zu sein schien, bekam der Hund an diesem Tage noch einmal 0,1 g Pyrodin subcutan injiziert.

Am 28. I. hatte der Harn zwar, wie es schien, schwach ikterische Farbe angenommen, die Gmelinsche und die Pettenkofersche Reaktion gaben wohl auch ein positives Resultat, aber dasselbe stand so hart an der Grenze des negativen, daß es erwünscht erschien, die Anzeichen der Pyrodinvergiftung deutlicher zu machen. Um nun gleichzeitig die Wirkung des Acetylphenylhydrazins vom Darme aus auch beim Normaltier beobachten zu können, bekam der Hund 0,1 g Pyrodin per os mit dem Futter. Im übrigen zeigte sich das Tier an diesem Tage ziemlich wohl und hatte auch sein Futter gefressen. Die Blässe der Kopfschleimhäute war geblieben.

Am 29. I. konnten die Proben von Gmelin und Pettenkofer ein Vorhandensein von Gallenfarbstoffen und Gallensäuren im Harn nicht mehr andeuten. Die Anämie der Kopfschleimhäute war dagegen dieselbe geblieben. Auch das Befinden des Tieres war weniger gut als am Tage vorher. Das an diesem Tage gereichte Futter rührte der Hund nicht an. Mit diesem Tage (29. I.) schloß der Versuch ab

Der Hund wog

am Anfang des Versuches . . . . 5,640 kg
am Ende desselben . . . . 5,250 „
verlor also . . . . 0,390 „

während des Versuches von seinem Gewichte.

Auf diese Weise überstand auch der Normalhund den Versuch im allgemeinen gut, wenn man wieder von der Magenverstimmung am letzten Tage absehen will, die sich infolge der Pyrodinapplikation per os eingestellt hatte. Die Injektionsstellen waren auch bei diesem Hunde gut geheilt. Eine Absceßbildung war nicht aufgetreten.

Wenn auch der spektroskopische Nachweis von Hämoglobin im Harne der Tiere nicht gelang, so beweisen doch die Erscheinungen der

Anämie an den sichtbaren Schleimhäuten des Kopfes, sowie die Gegenwart von Gallensäuren und Gallenfarbstoffen im Urin, daß das Pyrodin, sowohl beim entmilzten als beim Normalhund in Wirkung getreten ist.

Dabei scheinen aber die Hunde, obwohl sie beide genau dieselbe Dosis, 0,3 g Pyrodin (0,2 g subcutan und 0,1 g per os) erhalten hatten, nicht völlig gleich intensiv auf das Gift zu reagieren.

Denn während bei dem entmilzten Hunde von 6,960 kg Gewicht die Gmelinsche und die Pettenkofersche Reaktion das Vorhandensein von Gallenfarbstoffen und Gallensäuren im Harn zweifellos bewiesen, war diese Tatsache beim Normaltier von nur 5,640 kg Gewicht gerade noch angedeutet, so daß also die Erscheinungen des Ikterus beim entmilzten Hunde deutlicher ausgeprägt waren als beim Normaltier.

Diese Beobachtung scheint mit den Untersuchungen von Vitali[1]) nicht übereinzustimmen. Denn nachdem er unter anderem ausgeführt hat, daß die Milz eine stärkere und schnellere hämatolytische Wirkung als das Knochenmark und die anderen hämolytischen Organe besitze, und daß bei fehlender Milz die Lösung der roten Blutkörperchentrümmer weniger vollständig und weniger rasch vor sich gehe, da das Knochenmark und die anderen hämolytischen Organe nicht vikariierend einzutreten vermögen, sagt er, daß bei Vergiftungen mit Blutgiften bei Tieren, denen die Milz exstirpiert worden ist, darum in gleicher Zeit eine geringere Anhäufung von gelöstem Hämoglobin und dadurch auch weder Ikterus noch Hämoglobinurie eintrete.

Bezugnehmend auf den Versuch mit dem Normaltier lasse ich hier die Resultate aus den Analysen des Kotes in dieser Tabelle folgen.

Tabelle XI.

Datum	Gewicht des Kotes in g feucht	Gewicht des Kotes in g getrockn.	Eisengehalt des Kotes in mg	Durchschnittsgehalt an Eisen pro die, in mg	Bemerkungen
25. I. mittags	—	—	—		Injektion von 0,1 g Pyrodin subcutan
26 I.	62,20	16,40	23,87	10,52	
27. I.	—	—	—		Injektion von 0,1 g Pyrodin subcutan
28. I.	13,53	6,15	14,11	6,08	0,1 g Pyrodin per os
29, I.	11,68	2,46	4,12		

[1]) J. Vitali, Über die Tätigkeit der Milz, der Nieren und der Leber bei der Hämoglobinanämie und der Hämoglobinurie. La clinica medica italiana 1904, Nr. 4.

Demnach schied also der Normalhund während des Versuches in 25,01 g Trockenkot im ganzen 42,10 mg Fe, im Durchschnitt täglich 10,52 mg Fe aus.

Läßt man wiederum wie bei dem entmilzten Hunde die Rechnung erst am Tage nach dem ersten Kotabsatz, also am 27. I. beginnen, so schied das Normaltier in 8,61 g Trockenkot im ganzen 18,23 mg Fe aus, also im Durchschnitt täglich 6,08 mg Fe.

Demnach betrug die tägliche Durchschnittselimination an Eisen im Kote des Normalhundes 6,08 mg gegenüber 10,20 mg beim entmilzten Tiere.

Nun schied Gottliebs Normalhund von 8,950 kg Gewicht unter völlig physiologischen Verhältnissen, also ohne daß ihm z. B. Pyrodin eingespritzt worden wäre, im Durchschnitt täglich 3,5 mg Fe aus, nachdem ihm dieselbe äußerst eisenarme Nahrung von der Zusammensetzung:

Topfen . . . . 50 g
Schmalz . . . 50 g
Stärkekleister . 50 g

gereicht worden war, die auch mein Normalhund in einer geringfügigen, für den Versuch jedoch gleichgültigen Abänderung erhalten hatte.

Vergleicht man mit jenem von Gottlieb gefundenen Werte die Zahl 6,08 als Ausdruck für die tägliche Durchschnittselimination an Eisen im Kote meines Normalhundes, der unter dem sichern Einflusse der Pyrodinwirkung stand, so kommt man zu dem Schlusse, daß die durch das Blutgift hervorgerufene Steigerung der Hämolyse beim Normaltier zur Eisenausscheidung des Organismus einen nicht unwichtigen Beitrag liefert.

Es ist auch hier wieder angebracht, bei dem Vergleiche der täglich vom entmilzten Hunde ausgeschiedenen Eisenmenge mit der Durchschnittselimination an Eisen pro die im Kote des Normaltieres nach Applikation von Pyrodin den von Voit für den hungernden Hund gefundenen Wert in Betracht zu ziehen.

Demnach müßte der entmilzte Hund von 6,960 kg Gewicht, wenn er noch im Besitze seiner Milz wäre, im Hunger im Durchschnitt täglich 4,17 mg Fe ausscheiden.

In Wahrheit aber schied er bei der oben beschriebenen Versuchsanordnung unter dem Einflusse der Pyrodinwirkung 10,20 mg Fe pro die aus, so daß er also damit einen täglichen Überschuß von 6,03 mg Fe erzielte.

Stellt man dieselbe Betrachtung bei dem Normalhund an, so müßte dieser bei seinem Gewicht von 5,640 kg im Hunger 3,38 mg Fe täglich ausscheiden.

Unter der Einwirkung des Pyrodins schied er aber unter derselben Versuchsanordnung wie beim entmilzten 6,08 mg Fe pro die aus, so daß also der Überschuß in der täglichen Eisenausscheidung beim Normalhund sich auf nur 2,70 mg beläuft.

Demnach bleibt auch bei dieser Betrachtung der Normalhund mit seinem Überschuß in der täglichen Eisenausscheidung ganz beträchtlich hinter dem entmilzten Tiere zurück.

Wegen des nicht ganz sicheren Resultates der Harnuntersuchung auf Gallensäuren und Gallenfarbstoffen beim Normalhund bekam dieser am 1. II. noch einmal 0,1 g Pyrodin subcutan injiziert, um so die Wirkung des Präparates deutlicher in Erscheinung zu bringen.

Auf diese Weise hatte der Normalhund 0,3 g Pyrodin subcutan und 0,1 g Pyrodin per os, im ganzen also 0,4 g Pyrodin erhalten.

Mit der letzten Gabe von 0,1 g des Präparates subcutan schien jedoch die tödliche Dosis erreicht zu sein.

Denn der Hund zeigte am nächsten Tage, am 2. II., folgendes Krankheitsbild:

Das Haarkleid war aufgebürstet und glanzlos, die Augen waren matt, die Augenlidbindehäute waren blaß und sonderten ein schleimiges Sekret ab. Der Puls war beschleunigt und erfolgte 180 mal in der Minute, war aber sonst regelmäßig und ziemlich kräftig. Die Nasenlöcher waren durch getrocknetes Sekret zum größten Teile verklebt, so daß beim Atmen ein schniebendes Geräusch entstand. Die Atmung war beschleunigt; zuweilen konnte man sogar Atemnot beobachten. Das Sensorium war stark eingenommen, der Gang schwankend. Es zeigte sich Hinfälligkeit und Muskelschwäche. Die Futter- und Wasseraufnahme waren völlig unterdrückt, auch warme Milch wurde nicht genommen. — In den nächsten Tagen besserte sich der Zustand des Tieres, die genannten Symptome traten mehr zurück. Der Hund nahm auch etwas Milch. — Am 6. II. jedoch verschlechterte sich der Zustand des Tieres plötzlich derart, daß es an diesem Tage mittags gegen 12 Uhr verendete. — Eine Stunde nachher, um 1 Uhr nachmittags, wurde die Sektion gemacht.

Der Sektionsbefund war folgender:

Der Kadaver befand sich in gutem Nährzustand und wog 5,200 kg. Beim Eröffnen der Bauchhöhle zeigte sich das subcutane und subperitoneale Fettgewebe reichlich entwickelt. In der Bauchhöhle sammelte sich während der Sektion eine mäßige Menge Blut von auffallend dunkelroter bis schwärzlicher Farbe, also mit den Zeichen des Erstickungsblutes behaftet. Die Schleimhaut des Dünndarms war mit einer schmierigen gelbbräunlichen Schicht bedeckt, der Dünndarm war sonst leer. Im Dickdarm befand sich eine geringe Menge Inhalt von der oben beschriebenen Farbe. Der Mastdarm war mit festem Kot prall gefüllt. Im Magen befand sich eine ziemlich große Masse gelbbräunlichen dünnbreiigen Inhaltes. Die Schleimhaut des Magens war nicht verändert, eine Entzündung derselben infolge der Applikation des Pyrodins per os also nicht eingetreten. Die Leber hatte ihre normale Farbe verloren und einen Stich ins Gelbliche erhalten, hatte aber ihre Größe und Konsistenz nicht verändert. Die Gallenblase war ziemlich stark gefüllt. Die Milz war geringgradig geschwollen. Bei der Betrachtung des Blutgefäßsystems fiel die parenchymatöse Degeneration des Herzmuskels auf. Derselbe sah aus wie gekocht. Am Respirationsapparat sowie am Urogenitaltraktus war nichts Abnormes zu sehen. — Da bei dem Tiere die subcutanen Injektionen stets am Rücken gemacht worden waren, so

Gesamtübersicht.

Datum	Gewicht des Kotes in g feucht	Gewicht des Kotes in g getrockn.	Eisengeh. d. Kotes in mg	Durchschn.-Geh. an Eisen pro die in mg	Angewandte Präparate Datum	Angewandte Präparate	Tägl. Nahrung der Versuchstiere in g	Bestimmung sowie Gewicht der Versuchstiere a. Anfang d. Versuchs in kg	Anordnung der Versuche	
2.—3. XI.	—		—	20,31	2. XI. 3. XI. 4. XI.	Injektion von je $^1/_2$ g Tart. ferr. subc. (345 mg Fe)	Pferdefleisch (roh) 300,0	Entmilzter Hund von 4,950	1. Versuch	1. Versuchsreihe
4. XI.	24,23		18,43							
5. XI.	55,12		37,83							
6. XI.	36,14		44,59							
7. XI.	20,10		21,02							
9. XI.	—	—	—	7,41	9. XI. 10. XI. 11. XI.	Injektion von je $^1/_2$ g Tart. ferr. subc. (345 mg Fe)	Pferdefleisch (roh) 300,0	Normalhund von 3,650	2. Versuch	
10.—12. XI.	—	—	—							
13. XI.	58,35	16,10	30,70							
14.—15. XI.	—	—	—							
16. XI.	59,60	14,70	21,18							
16.—22. XI.	—	—	—	19,90	16. XI. 18. XI.	Injektion von je $^1/_2$ g Tart. ferr. subc. (345 mg Fe)	Pferdefleisch (roh) 450,0	Entmilzter Hund von 10,250	3. Versuch	
23. XI.	84,81	33,61	139,31							
8. XII.	—	—	—	15,40	8. XII. 10. XII.	Injektion von je $^1/_2$ g Tart. ferr. subc. (230 mg Fe)	Stärkekleister 100 Schmalz (Schwein) 50 Zucker 50 Topfen 50	Entmilzter Hund von 12,650	1. Versuch	2. Versuchsreihe
9. XII.	—	12,42	27,49							
10. XII.	—	—	—							
11. XII.	45,11	10,92	13,09							
12.—13. XII.	—	—	—							
14. XII.	61,35	26,12	51,86							
15. XII.	—	—	—							
30. XI.	—	—	—	5,50	30. XI. 5. XII.	Injektion von je $^1/_2$ g Tart. ferr. subc. (230 mg Fe)	Stärkekleister 50 Schmalz 50 Zucker 50 Topfen 50	Normalhund von 5,200	2. Versuch	
1.—3. XII.	—	—	—							
4. XII.	61,85	20,75	25,86							
5.—6. XII.	—	—	—							
7. XII.	44,64	13,14	11,66							
8. XII.	—	—	—							
10. I.	138,65	38,03	23,89	19,63		Keine	Stärkekleister 75 Zucker 75 Schmalz 75 Kein Eiweiß!	Entmilzter Hund von 14,300	1. Versuch	3. Versuchsreihe
11. I.	116,98	33,51	23,41							
12. I.	53,53	17,73	19,36							
13. I.	—	—	—							
14. I.	37,59	14,66	25,06							
15. I.	51,18	21,67	31,87							
16. I.	29,39	9,77	18,09							

5. I.	—	—	—			Keine	Stärkekleister 50 Zucker 50 Schmalz 50 Kein Eiweiß!	Normalhund von 5,700	2. Versuch	3. Versuchsreihe
6.—10. I.	—	—	—							
11. I.	36,10	13,60	27,88							
12. I.	—	—	—							
13. I.	12,31	2,50	4,11							
14. I.	6,55	3,02	6,93	6,12						
15. I.	—	—	—							
16. I.	30,18	11,29	32,22							
17.—18. I.	—	—	—							
19. I.	10,26	5,50	5,03							
20. I.	10,65	4,25	15,70							
5. II.	—	—	—			Keine	Stärkekleister 50 Zucker 50 Schmalz 50 Kein Eiweiß!	Normalhund von 6,500	1. Versuch	4. Versuchsreihe
6. II.	76,35	34,06	29,85							
7.—8. II.	—	—	—	8,71						
9. II.	27,07	10,54	10,80							
10. II.	46,25	16,95	24,05							
4. II.	—	—	—			Keine	Stärkekleister 50 Zucker 50 Schmalz 50 Eiweiß ca. 20	Entmilzter Hund von 16,550	2. Versuch	
5. II.	86,57	26,92	29,30							
6. II.	56,16	20,35	27,30							
7. II.	—	—	—							
8. II.	36,38	13,15	26,51							
9.—10. II.	—	—	—	22,19						
11. II.	40,04 morg. 28,63 abds.	16,03 9,94	41,21 38,16							
25. I.	—	—	—		25. I.	Injektion von je 0,1 g Pyrodin subcutan 0,1 g Pyrodin per os	Topfen 50 Zucker 25 Schmalz 25 Stärkekleister 25	Entmilzter Hund von 6,960	1. Versuch	5. Versuchsreihe
26. I.	54,19	20,41	25,16		27. I.					
27.—28. I.	—	—	—	13,19						
29. I.	26,28	11,38	33,53		28. I.					
30. I.	17,19	5,33	7,28	10,20						
25. I.	—	—	—		25. I.	Injektion von je 0,1 g Pyrodin subcutan 0,1 g Pyrodin per os	Topfen 50 Zucker 25 Schmalz 25 Stärkekleister 25	Normalhund von 5,640	2. Versuch	
26. I.	62,20	16,40	23,87	10,52	27. I.					
27. I.	—	—	—							
28. I.	13,53	6,15	14,11	6,08	28. I					
29. I.	11,68	2,46	4,12							

wurde in der ganzen Ausdehnung des Rückens die Haut abgehoben. Dabei zeigten sich keinerlei Entzündungserscheinungen.

Pathologisch war also:

1. der geringgradige Milztumor,
2. die parenchymatöse Degeneration des Herzmuskels,
3. die ins Gelbe hinüberspielende Farbe der Leber,
4. die dunkelrote bis schwärzliche Farbe des Blutes.

Um wieder auf den Vergleich der Eisenausscheidung bei dem entmilzten und Normalhunde zurückzukommen, sei wiederholt, daß der entmilzte Hund nach der korrigierten Rechnung im Durchschnitt pro die 10,20 mg Fe mit seinem Kote ausschied, während die tägliche Durchschnittselimination an Eisen in den Faeces des Normaltieres nur 6,08 mg betrug, so daß also der entmilzte Hund im Durchschnitt täglich 4,12 mg Fe mehr ausschied als der Normalhund von etwa demselben Gewicht unter den gleichen Bedingungen.

Die Pyrodinversuche sprechen also dafür, daß tatsächlich die Steigerung der Eisenausscheidung, welche der Blutkörperchenzerfall herbeiführt, beim entmilzten Hunde größer ist als beim normalen.

Vorausgesetzt, daß dieser Schluß richtig ist, so dürfte man daraus folgern, daß ein Teil des beim sonst normalen, aber milzlosen Tiere mehr ausgeschiedenen Eisens der normalen Hämolyse entstamme.

Mit einer gewissen Unsicherheit ist der Schluß deshalb behaftet, weil das Pyrodin nicht bloß Hämolyse, sondern auch Zellzerfall im Gewebe zur Folge hat.

Da die Hämolyse ihrerseits jedoch nur kleine Mengen Eisen frei macht, kann auch aus diesem Grunde die Wirkung nicht so prägnant sein, wie vermutlich den Tatsachen entspricht.

Demnach beruht also mit größerer Wahrscheinlichkeit die Mehrausscheidung von Eisen beim entmilzten Tiere nach Pyrodininjektion auf Hämolyse.

Resultate.

Die Resultate meiner Versuche fasse ich folgendermaßen zusammen:

1. Entmilzte Hunde scheiden auch 10 und 11 Monate nach der Entmilzung mehr Eisen aus als normale Hunde.

Daraus folgt, daß auch nach so langer Zeit eine Kompensation dieser Stoffwechselstörung nicht eingetreten ist.

2. Die subcutane Injektion von Eisen steigert in so geringer beziehentlich allmählicher Weise die Ausscheidung von Eisen, daß der an und für sich bestehende Unterschied in der Eisenausscheidung zwischen einem normalen und einem entmilzten Hunde nicht weiter beeinflußt wird.

Die Milz scheint demnach für die Verarbeitung des künstlich zugeführten Eisens von geringer Bedeutung zu sein.

3. Durch Pyrodin (Acetylphenylhydrazin) bewirkter Blutkörperchenzerfall steigert beim normalen und entmilzten Hunde die Ausscheidung von Eisen. Bei letzterem ist die Steigerung der Ausscheidung etwas größer.

Diese Tatsache spricht dafür, daß die Milz an der Verarbeitung des durch Hämolyse frei werdenden Eisens beteiligt ist. Aber diese Funktion der Milz kann nur von sehr geringem Umfange sein, da die gefundenen Unterschiede keine sehr großen sind.

4. Experimentell durch ungenügende oder fehlende Eiweißernährung bewirkter Zerfall von Körpersubstanz verursacht sowohl beim normalen wie beim entmilzten Tiere eine starke Steigerung der Eisenausscheidung.

Diese Tatsache spricht dafür, daß durch Zerfall von Körpersubstanz Eisen mobilisiert wird.

Die Erhöhung der Eisenausscheidung beim entmilzten Tiere ist aber unvergleichlich größer als beim normalen.

Die Annahme von Asher, daß die Milz ein im Stoffwechsel durch Zerfall von eisenhaltigem Körpermaterial, wenn man von den Blutkörperchen absehen will, frei werdendes Eisen verarbeitet, gewinnt durch diese Tatsache eine Stütze.

Die Beteiligung von Kerneisen hierbei ist möglich, aber noch nicht bewiesen.

Nachtrag. Die Hunde, welche zu den Untersuchungen von Großenbacher und Zimmermann gedient hatten, wurden nach Abschluß derselben getötet. Die Sektion, die also 11 Monate nach der Operation ausgeführt wurde, ergab, daß in beiden Fällen die Milz glatt exstirpiert worden und die Heilung eine normale gewesen war. Es fand sich keine Nebenmilz; die Lymphdrüsen der Umgebung waren nicht geschwollen und hatten nicht irgendwie den Charakter von Hämolymphdrüsen angenommen. Der Sektionsbefund ergab also keinen Anhaltspunkt für irgend ein vikariierendes Eintreten benachbarter Lymphdrüsen. (L. Asher.)

Literatur.

1. Gottlieb, Über die Ausscheidungsverhältnisse des Eisens. Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, Heft 5, 371 bis 386.

2. Neumann, Einfache Versuchsmethode (Säuregemischveraschung). Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 115ff.; 43, 32ff.

3. Voit, Physiologie des Gesamtstoffwechsels. Hermanns Handbuch 6, 384.

4. Asher, Centralbl. f. Physiol. 22, Nr. 12, 1908.

5. Pugliese und Luzzatti, Arch. it. de Biol. 33, fasc. 3.

6. Vitali, Über die Tätigkeit der Milz, der Nieren und der Leber bei der Hämoglobinämie und der Hämoglobinurie. La clinica medica italiana 1900, Nr. 4.

Sind in den Organzellen Antikörper nachweisbar?

Von

E. Weil und H. Braun.

(Aus dem hygienischen Institute der deutschen Universität in Prag.)

(Eingegangen am 27. März 1909.)

Der einwandfreie Nachweis der Antikörper in den Organzellen ist in keiner Weise erbracht.

Die Schwierigkeit, diesen zu führen, ist in der mangelnden Methodik zu suchen. Allen bisherigen Experimenten, welche sich auf das Vorhandensein von Antistoffen in den Organen beziehen, muß deshalb die vollständige Beweiskraft fehlen, weil ein quantitatives Arbeiten bei dem wechselnden Gehalt an antikörperhaltigem Blut und Gewebssaft nicht recht möglich war und die Identität der in den Organen festgestellten Immunkörper mit den Serumstoffen nicht exakt nachgewiesen wurde.

Um ein richtiges Arbeiten zu ermöglichen, kam es uns hauptsächlich darauf an, die Organe blutfrei und die Zellstoffe in möglichst unveränderter Form zu gewinnen.

Wir bedienten uns der folgenden erprobten Methode zur Untersuchung überlebender Organe.[1])

Die Tiere werden aufgespannt und in die frei präparierte linke Vena jugularis externa eine Kanüle eingebunden, die mit einem Glaszylinder kommuniziert, welcher mit auf Körpertemperatur erwärmter Kochsalzlösung gefüllt ist. Aus der rechten Carotis wird das Tier verblutet. Nachdem das Blut aus dem Gefäß nur tropfenweise herausfließt, wird es temporär abgeklemmt und die Kochsalzlösung einströmen gelassen. Das

---

[1]) Näheres bei Wiechowski, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 9, 232, 1907.

Tier erholt sich, atmet frequent, und der Blutdruck stellt sich leidlich wieder her. Dann wird die Carotisklemme gelüftet und die blutige Spülflüssigkeit bei kontinuierlichem Zufluß aus dem Zylinder in die Jugularis so lange herausgelassen, bis eine Zeitlang aus der Carotis nur reine Kochsalzlösung herausfließt. Dann wird die Bauchhöhle und der Thorax eröffnet und die Kanüle in der Brusthöhle in die Vena cava inferior eingebunden, um die Bauchorgane auszuspülen. Durch leichte Massage hilft man dem Durchspülen nach. Die Vena cava inferior wird mit der Aorta oberhalb des Beckenringes durchschnitten und die Spülung so lange fortgesetzt, bis aus den großen Gefäßen reine Kochsalzlösung fließt. Dann werden die Organe herausgenommen, mit Kochsalzlösung abgespült, zerkleinert und durch ein Sieb passiert. Der Organbrei wird zum Hintanhalten von Fäulnis mit Toluol versetzt und mit diesem innig vermengt. Die halbflüssige Masse wird auf Glasplatten dünn aufgestrichen und in einem Wärmeschrank bei 37° getrocknet. Die in einigen Stunden trockenen Organe werden abgekratzt und im Exsiccator über Schwefelsäure in Glasbüchsen aufbewahrt. Die Organe haben wir in den nächsten Tagen untersucht.

0,1 g des Trockenorgans wird mit 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung oder 0,05%iger Sodalösung in steriler Reibschale fein verrieben und im Eisschrank aufbewahrt.

Auf diese Art wurden Immunkaninchenorgane auf Antikörper und Schutzstoffe untersucht.

Zunächst soll über Cholerakaninchen berichtet werden.

Diese wurden auf ihren Gehalt an Agglutininen geprüft. Der Untersuchung auf letztere und auf die später zu besprechenden Präcipitine stellen sich wegen der spontanen Ausflockung der Kochsalzextrakte Schwierigkeiten entgegen [Pohl[1])]. Diese Erscheinung wird, wie uns unsere Versuche lehrten, weiter durch lebende Cholerabakterien beschleunigt. Außerdem ist die Sterilität der Organplasmen stets eine mangelhafte, was natürlich beim Verweilen der Agglutinationsproben bei Bruttemperatur zu unkontrollierbaren Bedingungen führt. Als zweckmäßig erwies sich unter Berücksichtigung all dieser Verhältnisse folgende Versuchsanordnung:

---

[1]) Pohl, Über Organeiweiß. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 381, 1906.

0,5 g des trockenen Organes wurden in steriler Reibschale zu feinem Mehl verrieben und mit 5 ccm 0,05 %iger Soda- und 0,08 %iger Thymollösung verrührt und 24 bis 48 Stunden bei 0° stehen gelassen. Der ungelöste Anteil wurde abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf ihren Agglutiningehalt gegenüber $^1/_{20}$ Choleraagarkultur, die bei 60° abgetötet war, geprüft.

Die Organauszüge von fünf normalen Kaninchen erwiesen sich auch in der stärksten Konzentration (1 ccm) als unwirksam. Anders verhielten sich die Immuntiere. Außer der wechselnd starken Wirkung des Serums (2 Sera agglutinierten bis 0,0005, 2 Sera bis 0,01, 1 Serum bis 0,001 ccm auf 1 ccm der Bakterienaufschwemmung), zeigte bei allen Tieren (4 Kaninchen) die Niere eine Agglutinationsreaktion in der Menge von 0,2 ccm des Organplasmas auf 1 ccm Bakteriensuspension, 0,02 ccm erwies sich als unwirksam.

Ebenso konstant wirkte das Knochenmark, nur in viel höherem Grade (0,02 ccm des Organauszuges bewirkte eine komplette Klärung). Hervorzuheben wäre, daß die Milzextrakte bei zwei Kaninchen, deren Nieren (0,2 ccm) und Sera (0,01 und 0,0005 ccm) agglutinierten, unwirksam waren. Da wir der Gefahr falscher Schlußfolgerung entgehen möchten, wollen wir nur diejenigen von unseren Experimenten als beweisend ansehen, in denen der Milzextrakt unwirksam war, da nur in diesen die Ausspülung als vollkommen einwandfrei anzusehen ist, zumal es sich bei der Milz um ein Organ handelt, welches der Blutbefreiung schwer zugänglich ist.

Aus demselben Grunde kann die starke Wirksamkeit des Knochenmarkextraktes nur auf das Blut zu beziehen sein. Leber, Muskel und Gehirn waren stets unwirksam. Aus dem Befund der Agglutinine in den Nieren darf wohl nicht geschlossen werden, daß die Niere als Ursprungsstätte der Agglutinine anzusehen ist, da auch die Vorstellung, daß es sich um ein Anhäufen von ausgeschiedenen Serumagglutininen in den Nieren handelt, ebensolche Berechtigung hätte. Wir möchten aber hierbei bemerken, daß der einwandfreie Nachweis von Agglutininen im Harn nicht gelungen ist, vielmehr müssen wir diesbezüglich auf die sehr genaue Arbeit von Stäubli[1]) hin-

---

[1]) Stäubli, Centralbl. f. Bakt. 33, 375.

weisen, welcher bei Meerschweinchen, die nach künstlicher Immunisierung eine sehr starke Agglutinationskraft des Blutes aufwiesen (bis 1:25000) den Harn in der stärksten Konzentration unwirksam fand. Unsere konstant positiven Befunde von Choleraagglutininen in den Nierenzellen vermögen wir nicht mit Sicherheit zu deuten.

Da es uns bei unseren Versuchen nicht darauf ankam, über die Ursprungszelle der Antikörper Klarheit zu erlangen, sondern nur darauf, ob die Organzellen überhaupt die im Blutserum vorhandenen Antistoffe aufweisen, so haben wir die Organe nicht im Beginn der Immunisierung, sondern auf der Höhe des Antikörpergehaltes des Blutes untersucht.

Die analogen Versuche mit Organen eiweißpräcipitierender Kaninchen hatten ein durchgehend negatives Resultat. Die Sera flockten aus in der Menge von 0,1 Antiserum und 0,001 resp. 0,0001 Antigen, die Organkochsalzextrakte reagierten nicht.

Die Spontankoagulation des Organeiweißes hemmten wir durch Zusatz eines fremdartigen, nicht als Antigen angewandten Serums (Pohl, l. c.), das mit dem spezifischen Antiserum keine Reaktion gibt und die Präcipitation nicht beeinflußt (0,1 ccm Hundeserum bei Menschen- und Pferdeantiserum).

Unsere Versuche, die wir angestellt haben, um über den Gehalt der Organzellen an Amboceptoren etwas zu erfahren, führten bisher zu keinem eindeutigen Resultate, da der Gehalt der Extrakte an nicht spezifisch cytolytisch wirkenden Stoffen ein großer ist, so daß eine Analogisierung der letzteren mit den spezifisch wirkenden Serumstoffen uns unberechtigt schien.

Von besonderem Interesse war die Untersuchung, ob die Organe Schutzstoffe gegen Infektionserreger enthalten. Einige wenige Versuche, die wir mit Lebern natürlich gegen Schweinerotlauf immuner Tiere an Mäusen ausgeführt haben, verliefen negativ.

Zur Untersuchung des Schutzstoffgehaltes der Organe künstlich immunisierter Tiere wählten wir Hühnercholerakaninchen. Dieser Infektionserreger schien uns deshalb als der geeignetste, weil jeder Schutz, den man gegen ihn erzielt, ein spezifischer sein muß. Eine nicht spezifische Resistenz, die man gegen viele und auch höchst infektiöse Mikroorganismen mit den verschiedensten Stoffen (Sera, Bakterien, Bakterienextrakt, ins-

besondere Fäulnisprodukte) erzielt, ist bei dem von uns verwendeten Stamm vollständig ausgeschlossen. Die Kaninchen wurden subcutan mit sterilisiertem Kaninchenaggressin vorbehandelt. Das Serum aller Tiere schützte Mäuse in der Dosis 0,1 ccm, seltener 0,05 ccm gegen die vieltausendfache tödliche Dosis. Gleich das erste Kaninchen wies eine deutliche Schutzwirkung in der Leber und Niere auf. 0,1 g des Trockenorgans wurde in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung in der Reibschale verrieben, 24 Stunden im Eisschrank stehen gelassen und dann diese Aufschwemmung subcutan injiziert. Die subcutane Infektion erfolgte 24 Stunden nachher. Gleichzeitig wurden auch die Organemulsionen zentrifugiert und sowohl der Abguß als auch der Rückstand, der in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen wurde, auf seinen Schutzwert geprüft. Die Kochsalzextrakte als auch die ganzen Organemulsionen (Leber und Niere) zeigten eine deutliche Schutzwirkung, die dem abzentrifugierten Rückstand vollständig fehlte. Wir machten uns den Einwand, daß es sich bei diesem Tier um eine mangelhafte Spülung handle, da dasselbe das allererste Tier war, an welchem wir die Methodik versucht haben.

Bei unseren sämtlichen folgenden Versuchen (5 Kaninchen), die zum Teil länger als das erste immunisiert wurden, konnte in keinem Organ auch nur eine Andeutung von Schutzwirkung aufgefunden werden. Konstant wirkten bei allen Tieren das Trockenserum und das Knochenmark. Letzteres, wie schon hervorgehoben wurde, wahrscheinlich vermöge seines Blutgehaltes. Untersucht wurde die Leber, Niere, Milz, Thymus, Gehirn, Muskel.

Aus allen unseren mitgeteilten Versuchen müssen wir den Schluß ziehen, daß die im Serum vorkommenden Antikörper und Schutzstoffe, wenn sie überhaupt in den Organzellen vorhanden sind, unwirksam und wasserunlöslich sein müßten, vielleicht infolge besonderer Bindung im Sinne Ehrlichs.

Wir stellten uns daher die Aufgabe, die wasserunlöslichen Stoffe einer Fraktionierung und alle Zellbestandteile einer Aufschließung zu unterziehen. Inzwischen erschien eine Mitteilung von Heim[1]), nach welcher es ihm gelungen ist, in verfaulten

---

[1]) Heim, Münch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 1.

Organen pneumokokkenimmunisierter Tiere Schutzstoffe zu finden. Wiewohl dieser Methode die theoretische Berechtigung nicht abzusprechen ist, glauben wir, daß es zum Nachweise der Antikörper in den Zellen noch weiterer Stützen bedarf. Insbesondere wird es sich bei Infektionsversuchen, bei welchen stets die nicht spezifische Resistenz eine große Rolle spielt, als notwendig erweisen, sich durch entsprechende Kontrollen dagegen zu schützen. Obzwar diesbezügliche Angaben in der Arbeit von Heim fehlen, so zweifeln wir nicht daran, daß diese notwendigen Kontrollen, wie die Einverleibung von verfaulten normalen Organen, faulen Nährflüssigkeiten und Extrakten der verwendeten Anaerobier, nicht unterblieben sind. Auch möchten wir bei diesbezüglichen Versuchen nicht darauf verzichten, die Organe blutfrei zu spülen.

Zur Kenntnis der Zuckerspaltungen.

4. Mitteilung.

Die Elektrolyse des Glycerins und des Glykols.

Von

Walther Löb und Georg Pulvermacher.

(Aus der biochemischen Abteilung des Rudolf Virchow-Krankenhauses in Berlin.)

(Eingegangen am 23. März 1909.)

In der dritten Mitteilung ist der Nachweis geführt worden, daß der Traubenzucker unter dem Einfluß des elektrolytisch in saurer Lösung entwickelten Sauerstoffs in Pentose und Formaldehyd gespalten wird. Es ist nun, um einen Einblick in den Gang des Zuckerzerfalls zu erhalten, von Interesse, zu untersuchen, ob die in der Reaktion

$$C_6H_{12}O_6 = C_5H_{10}O_5 + CH_2O$$

in Erscheinung tretende Depolymerisierung des Zuckermoleküls eine fortschreitende ist, ob eine Pentose, eine Tetrose, Triose und Diose auch stets Formaldehyd neben dem gegenüber dem Ausgangsmaterial um ein Kohlenstoffatom ärmeren Zucker liefert. Ein Vorversuch mit l-Arabinose, in der Anordnung der Traubenzuckerelektrolyse durchgeführt, lieferte Formaldehyd, von Glycerinaldehyd und Dioxyaceton freien Zucker, aus dem wir bisher eine Tetrose nicht isoliert haben, sowie Ameisensäure und nicht flüchtige Säuren, deren Calciumgehalt mit 19,02 % bis 21,00 % in mehreren Versuchen den des trioxyglutarsauren Calciums (18,39 %) übertraf und dem des weinsauren Calciums (21,31 %) nahe kam. Diese Elektrolysen verliefen ohne Gasentwicklung.

Vorerst aber wurde unsere Aufmerksamkeit durch die Elektrolyse des Glycerins in 5%iger Schwefelsäure an einer Bleianode in Anspruch genommen. Wir wählten dieses bequem zugängliche Ausgangsmaterial, weil zweifellos die erste Phase der Oxydation in der Bildung des Glycerinaldehyds besteht,[1]) der auf diese Weise mithin leicht in seinem Verhalten bei der Elektrolyse geprüft werden kann.

Das Resultat war ein ungemein überraschendes. Wie wir erwarteten, fand eine reichliche Bildung von Formaldehyd statt; daneben ließ sich ein Sirup isolieren, der frei von Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Dioxyaceton und Hexose war, hingegen eine Pentose, mit großer Wahrscheinlichkeit i-Arabinose, enthielt.

Die Entstehung einer Pentose aus Glykolaldehyd in Gegenwart des kolloidalen Bariumcarbonats ist kürzlich von Neuberg[2]) beobachtet worden, der aus dieser Tatsache den Schluß auf eine vorhergehende Depolymerisierung des Glykolaldehyds zieht. Der Eintritt dieser in saurer Lösung überraschenden Synthese kann auch nur in der Weise gedeutet werden, daß ihr eine Depolymerisierung des Glycerinaldehyds voraufgeht.

Von den verschiedenen Möglichkeiten der Pentosebildung:

$$CH_2OHCHOHCHO + CH_2OHCHO \longrightarrow CH_2OH(CHOH)_3CHO$$
$$2CH_2OHCHO + CH_2O \longrightarrow CH_2OH(CHOH)_3CHO$$
$$5CH_2O \longrightarrow C_5H_{10}O_5$$

veranlassen nach unseren bisherigen Versuchen die beiden letzten Vorgänge die Synthese nicht. Denn bei der Wahl von Glykol als Ausgangsmaterial der Elektrolyse, die über den Glykolaldehyd zu Formaldehyd führt und von letzterem bis 11,5% des Ausgangsmaterials liefert, entsteht keine Spur einer Pentose, hingegen ein Zucker, der in seinen Derivaten die Eigenschaft einer Hexose zeigt. Man muß mithin annehmen, daß weder Glykolaldehyd allein, noch Formaldehyd allein, noch ein Gemisch beider in schwefelsaurer Lösung die Bedingungen zu einer Pentosesynthese vorfinden. Wir ziehen daraus den Schluß, daß der zunächst entstehende Glycerinaldehyd eine der des Traubenzuckers analoge Spaltung erleidet:

---

[1]) Vgl. Van Deen, Chem. Centralbl. 1863, 501; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 23, 2114, 1890.

[2]) Diese Zeitschr. 12, 337, 1908.

$$C_3H_6O_3 \longrightarrow C_2H_4O_2 + CH_2O$$

und daß Glycerinaldehyd und Glykolaldehyd in statu nascendi zur Pentose zusammentreten.

Daß die beiden Aldehyde im Reaktionsgemisch nicht aufzufinden sind, erklärt sich aus ihrer äußerst leichten Oxydierbarkeit, während Pentose und Formaldehyd, wie schon die Traubenzuckerversuche, dann aber auch die mit i-Arabinose lehrten, eine verhältnismäßig große Resistenz gegen den anodischen Sauerstoff unter den gewählten Versuchsbedingungen besitzen, zumal wenn leichter oxydierbare Stoffe zugegen sind.

Als einzige flüchtige Säure entsteht als Oxydationsprodukt des Formaldehyds Ameisensäure; die nicht flüchtigen Säuren, als Calciumsalze isoliert, gaben bei der Analyse bei verschiedenen Versuchen schwankende Werte, und zwar 19,11% bis 26,14%; anscheinend liegt in ihnen ein Gemisch von Dicarbonsäuren der C_5- (18,35% Ca) und C_3- (25,32% Ca) Reihe vor. Daß glykolsaures Calcium (21,06%) zugegen ist, erscheint nach der Elektrolyse des Glykols, die fast keine nicht flüchtigen Säuren — stets nur Spuren — liefert, unwahrscheinlich. Auch waren die Reaktionen auf Glykolsäure negativ. Hingegen wies die reichliche Gasentwicklung (CO_2 und CO) während der Elektrolyse des Glykols darauf hin, daß der leicht verbrennbare Glykolaldehyd eine weitgehende Oxydation erleidet, sofern er nicht durch synthetische Vorgänge der Wirkung des Sauerstoffs entzogen oder schwerer zugänglich gemacht wird.

Die früheren Versuche über die Elektrolyse des Glykols, Glycerins und der Glykolsäure, die im Gegensatz zu unseren Versuchen nicht an den die oxydierende Wirkung verstärkenden Bleianoden, sondern an Platinelektroden ausgeführt sind, bestätigen unsere Beobachtungen und Auffassungen.

Renard[1]) erhielt bei der Elektrolyse des Glykols in schwefelsaurer Lösung Kohlenoxyd, Kohlensäure, Trioxymethylen, Glykolsäure und eine der Glucose isomere Substanz. Glykolsäure aber zerfällt, als Natriumsalz elektrolysiert, nach v. Miller und Hofer[2]) hauptsächlich in Kohlensäure und Formaldehyd neben wenig Kohlenoxyd und Ameisensäure; sie erleidet also sehr leicht eine weitergehende Oxydation:

[1]) Ann. chim. phys. [5], 17, 303, 313, 1879.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 27, 467, 1894.

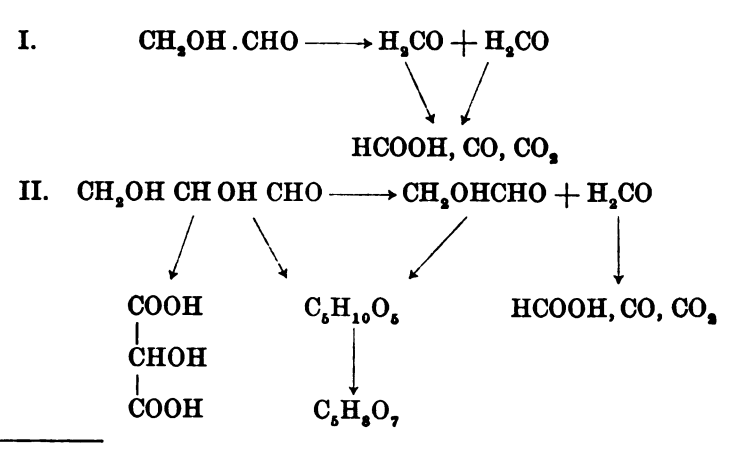
$$CH_2OHCOO + OH = CH_2O + H_2O + CO_2,$$

die unter den von uns gewählten Bedingungen noch verstärkt erscheint.

Glycerin, von Renard[1]) und Mc Coy[2]) in saurer Lösung an Platinanoden elektrolysiert, zerfällt nach den Angaben der beiden Forscher in Kohlenoxyd, Kohlensäure, Essigsäure, Glycerinaldehyd und einen Körper, der als Bariumsalz die Zusammensetzung $(C_3H_3O_4)_2Ba$ zeigte [glycerinsaures Barium $(C_3H_5O_4)_2Ba$?]. Bei länger durchgeführten Elektrolysen entstand nach Renard eine der Glucose nahestehende Substanz.

Die Versuche von Bartoli und Papasogli[3]) an Kohlenanoden sind für die hier behandelten Fragen bedeutungslos. Die Glycerinsäure selbst zerfällt nach v. Miller und Hofer leicht weiter in Kohlenoxyd, Kohlensäure, Formaldehyd und Ameisensäure, während die nachweisbare Bildung von Glykolaldehyd nach Neubergs[4]) Versuchen unter Bedingungen, die eine geringe Oxydationswirkung ermöglichen, stattfindet.

Wenn wir die Bildung der Aldehyde, des Glykolaldehydes und des Glycerinaldehydes, als den ersten Vorgang der Elektrolyse betrachten, so bietet sich für den Zerfall der Aldehyde das dem elektrolytischen Abbau des Traubenzuckers ganz entsprechende Bild.



[1]) Compt. rend. 81, 188, 1875; 82, 562, 1876.
[2]) Americ. Chem. Journ. 15, 656, 1893.
[3]) Gazz. chim. 13, 287, 1883.
[4]) Diese Zeitschr. 7, 537, 1908.

Experimenteller Teil.

I. Die Elektrolyse des Glycerins.

20 g Glycerin werden in 50 ccm 5%iger Schwefelsäure gelöst und in der bei der Elektrolyse des Traubenzuckers beschriebenen Anordnung unter Verwendung einer gekühlten Bleianode der Wirkung des Stromes ausgesetzt. Die Amp.-Stunden waren so bemessen, daß auf 1 Mol. Glycerin 1 Grammatom Sauerstoff verbraucht wurde.

Nach beendigter Elektrolyse wird die stark nach Formaldehyd riechende Anodenflüssigkeit kalt mit gefälltem Calciumcarbonat neutralisiert und aus dem Filtrat mit Wasserdampf der Formaldehyd vollständig abdestilliert. Der Gehalt des Destillates an Formaldehyd läßt sich, da keine andere Substanz zugegen ist, sofort jodometrisch bestimmen.

Die mit Wasserdampf behandelte Lösung wird von etwa ausgeschiedenem Calciumsulfat filtriert und im Vakuum bei 50° Badtemperatur zur Trockne gebracht. Der zurückbleibende Sirup, der aus unverändertem Glycerin, Zucker und den Calciumsalzen von flüchtigen und nicht flüchtigen Säuren besteht, wird mehrmals mit absolutem Alkohol längere Zeit ausgekocht, wobei nur die Calciumsalze ungelöst zurückbleiben. Zur Trennung der flüchtigen und nicht flüchtigen Säuren löst man die letzteren in Wasser, säuert mit Oxalsäure an und destilliert die Ameisensäure, welche als einzige flüchtige Säure entsteht, mit Wasserdampf vollständig ab. Die Identität wurde durch die Analyse des Bariumsalzes erbracht; ihre Menge läßt sich direkt titrimetrisch ermitteln.

Die von der Ameisensäure befreite Lösung, abermals mit Calciumcarbonat neutralisiert und durch Filtration von diesem und dem oxalsauren Calcium befreit, liefert beim Eindampfen im Vakuum bei 50° die Calciumsalze der nicht flüchtigen Säuren. Zu ihrer Reinigung werden sie in wenig Wasser gelöst und nach der Filtration von noch vorhandenem Calciumsulfat durch Einfließenlassen der Lösung in einen Überschuß von Alkohol gefällt. Da eine weitere Reinigung, als eine mehrfache Wiederholung dieser Operation nicht angängig war, beschränkten wir uns auf die Bestimmung des Calciumgehaltes. Die gewonnenen Werte wiesen darauf hin, daß vorwiegend

Tartronsäure entstanden war; in einigen Versuchen schien aber Trioxyglutarsäure als Oxydationsprodukt einer Pentose reichlicher zugegen zu sein.

Die absolut alkoholische Lösung hinterläßt bei dem Eindampfen im Vakuum einen Sirup, der, in Wasser gelöst, durch alle Reaktionen die Gegenwart eines Zuckers verrät. Die nähere Untersuchung zeigte, daß hauptsächlich eine Pentose entstanden ist. Die Lösung des Sirups gärt nicht mit Hefe, ist optisch inaktiv, enthält weder Dioxyaceton, dessen Methylphenylosazon darzustellen vergeblich versucht wurde, noch Glycerinaldehyd, noch Glykolaldehyd, deren Gegenwart durch die unlöslichen Phloroglucinverbindungen leicht erkennbar ist. Hingegen ist die Bialsche Orcinreaktion stark positiv; die quantitative Bestimmung nach Tollens zeigte, daß etwa 5 % des alkoholischen Extraktes aus einer Pentose bestanden. Mittels Phenylhydrazins läßt sich in geringer Menge ein aus heißem Wasser krystallisierendes Osazon gewinnen, das nach allen Eigenschaften und dem Schmelzpunkt als Osazon der i-Arabinose erscheint. Der Schmelzpunkt schwankte bei einzelnen Präparaten von 169° bis 174°. Bei anderen Versuchen trat aber bereits bei 151° Zusammensickern ein und es scheint, daß in diesen Fällen etwas Glycerosazon beigemischt war, das sich auch durch mehrfaches Umkrystallisieren aus Wasser nicht entfernen ließ. Bei der schlechten Ausbeute mußten die Stickstoffanalysen mit sehr geringen Substanzmengen ausgeführt werden, jedoch zeigt die Übereinstimmung einer Anzahl von Analysen ihre genügende Sicherheit an.

Es gaben:

0,0324 g bei 22° und 774 mm Hg 5,5 ccm N = 19,67 %,
0,0362 „ „ 16° „ 745 „ „ 6,2 „ „ = 19,63 %.

Ein Pentosazon verlangt 17,18 %. Berücksichtigt man, daß der Stickstoffgehalt stets etwas zu hoch gefunden wird und der hierdurch veranlaßte Fehler bei der geringen Substanzmenge sehr in Erscheinung treten muß, so steht das Analysenresultat nicht in Widerspruch mit der Annahme, daß ein Pentosazon vorliegt, und mit den qualitativen Reaktionen, die die Gegenwart einer Pentose sicher beweisen. Auch Proben, deren unscharfer Schmelzpunkt die Beimischung von Glycerosazon als möglich erscheinen ließ, gaben naheliegende Werte (19,50 %).

Glycerosazon selbst enthält 20,82 % Stickstoff, schmilzt aber bereits bei 132°. Die Möglichkeit, daß durch Kondensation des Glykolaldehyds eine Erythrose entstanden war, glauben wir aus verschiedenen Gründen ausschließen zu müssen. Erstens liefert die Elektrolyse des Glykols keine Tetrose, zweifellos aber als erste Phase den Glykolaldehyd. Zweitens stimmt der nach der Tollensschen Furfurolmethode ermittelte Pentosengehalt etwa auf die isolierten Mengen des Osazons.

So wurden in 3,9 g Alkoholextraktes 0,1756 g Furfurolphlorogluoid gefunden, entsprechend 0,204 g Pentose. Auf die aus dem Versuch erhaltene Menge von 6,5 g Alkoholextrakt umgerechnet, ergibt sich, daß in diesem nur 5,23 % Pentose enthalten sind.

Die Gasentwicklung ist während der Elektrolyse des Glycerins eine relativ reichliche. Ein Versuch, der 12 Amp.-Stunden mit 0,5 Amp. durchgeführt wurde, lieferte im ganzen 975 ccm Gas, das 14,0 % Sauerstoff, 67,0 % Kohlensäure und 18,2 % Kohlenoxyd enthielt.

Ein zweiter Versuch unter denselben Bedingungen gab in der gleichen Zeit 730 ccm Gas: 4,1 % Sauerstoff, 81,8 % Kohlensäure, 14,0 % Kohlenoxyd. Andere Gase waren außer Luft, welche die Zelle zu Beginn der Elektrolyse erfüllte, in dem Gemisch nicht nachweisbar. Der Sauerstoffgehalt der Luft ist bei den vorstehenden Angaben in Abzug gebracht.

Die Calciumsalze der nicht flüchtigen Säuren wurden zur Analyse erst im Vakuum, dann bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Für die in Frage kommenden Säuren ist der Calciumgehalt der folgende:

Tartronsaures Calcium . . Ca : 25,39 %,
Trioxyglutarsaures Calcium Ca : 18,39 %,
Glycerinsaures Calcium . Ca : 16,03 %.

Bei einem Versuch, der mit 20 g Glycerin 12 Amp.-Stunden mit 0,5 Amp. durchgeführt war, enthielt das resultierende Calciumsalz 26,14 % Ca,

0,0427 g Salz gaben 0,0157 g CaO.

In einem zweiten, unter gleichen Bedingungen ausgeführten Versuch gaben

0,111 g Salz 0,02997 g CaO; Ca = 19,11 %.

Es scheint demnach, daß das Überwiegen der durch Oxydation des Glycerins entstehenden Tartronsäure gegenüber der durch Oxydation der Pentose resultierenden Trioxyglutarsäure durch nicht genau präzisierte Bedingungen, wie geringe Schwankungen der Versuchstemperatur, veranlaßt ist. Daß die beiden genannten Säuren tatsächlich vorliegen, ist durch die Calciumbestimmungen natürlich nicht exakt bewiesen, nach den anderen Produkten der Elektrolyse aber sehr wahrscheinlich.

Eine Reihe von Versuchen ist mit ihren Ergebnissen in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Nr.	Zusammensetzung der Anodenlösung	Stromverhältnisse	Formaldehyd	Ameisensäure	Zuckersirup	Ca-Salze der nicht flüchtigen Säuren
1	20 g Glycerin 50 ccm 5% H_2SO_4	0,5 Amp. 12 Amp.-Std.	0,96 g = 4,8%	—	11 g	—
2	"	"	1,60 g = 8,0%	0,43 g = 2,15%	11,5 g	2,5 g
3	"	"	1,30 g = 6,5%	0,62 g = 3,1%	13 g	—
4	"	0,5 Amp. 24 Amp.-Std.	1,77 g = 8,85%	1,36 g = 6,8%	6,5 g	1,5 g
5	30 g Glycerin 50 ccm 5% H_2SO_4	0,5 Amp. 18 Amp.-Std.	3,25 g = 10,85%	1,85 g = 6,17%	13,8 g	1,7 g
6	50 g Glycerin 125 ccm 5% H_2SO_4	1 Amp. 30 Amp.-Std.	2,16 g = 4,3%	2,05 g = 4,1%	20 g	2,0 g

Die unter der Rubrik „Zuckersirup" stehenden Werte umschließen auch die Mengen des noch reichlich unangegriffenen Glycerins. Ein gesetzmäßiger Einfluß der Versuchsdauer und der Stromverhältnisse, die aus den in der dritten Mitteilung[1]) angegebenen Gründen auf die Angabe der Stromstärke beschränkt sind, läßt sich nicht feststellen. Die Ausbeuten an Pentosen

[1]) Diese Zeitschr. 17, 130, 1909.

sind meist nicht festgestellt, weil bei ihrer geringen Menge das Osazon zur Analyse dargestellt werden mußte. Die Analysenresultate der aus verschiedenen Versuchen gewonnenen Osazone gaben stets übereinstimmende Werte, die bereits angegeben sind.

II. Verhalten des Glycerins in schwefelsaurer Lösung gegen Bleisuperoxyd.

Da die Wirkung der Bleianode in schwefelsaurer Lösung auf die intermediäre Bildung einer Bleisuperoxydschicht zurückgeführt werden kann, so war es von Interesse, die Einwirkung des Bleisuperoxydes auf Glycerin unter den bei der Elektrolyse gewählten Lösungsbedingungen zu untersuchen. Das Resultat war eine Bestätigung unserer elektrolytischen Versuche. Es zeigte sich dabei, daß die niedrige Temperatur der Anodenflüssigkeit ein wesentlicher Faktor für den Gang der Elektrolyse ist. Bei den chemischen Versuchen wurde in Anlehnung an die elektrolytischen Verhältnisse die Menge des Bleisuperoxyds so gewählt, daß ein Grammatom aktiven Sauerstoffs einem Mol Glycerin entsprach.

Kocht man 10 g Glycerin in 215 ccm 5 $^0/_0$iger Schwefelsäure mit 26 g Bleisuperoxyd, so tritt unter starker Kohlensäureentwicklung schnelle und weitgehende Oxydation ein. Es bildet sich viel Formaldehyd und Ameisensäure, aber keine Pentose, kein Dioxyaceton, kein Glycerinaldehyd. Es entstehen bei einem zweistündigen Versuch also lediglich die beständigen Produkte, zu denen der Formaldehyd gehört, unter teilweise vollständiger Verbrennung des Glycerins zu Kohlensäure.

Anders aber verläuft der Versuch, wenn man 20 g Glycerin, 52 g Bleisuperoxyd und 430 ccm 5 $^0/_0$iger Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur unter häufigem Umschütteln stehen läßt. Unter Selbsterwärmung der Flüssigkeit entweichen Blasen von Kohlensäure, ohne daß die Mischung außer dem Auftreten eines starken Formaldehydgeruches eine äußerliche Veränderung aufweist.

Nach dreitägigem Stehen wurde die Flüssigkeit vom Bleisuperoxyd abfiltriert und das Filtrat genau wie die Anodenlösung der Elektrolyse aufgearbeitet. Das Resultat war das folgende:

Formaldehyd: 2,8 g = 14 %,
Ameisensäure: 1,43 g = 7,15 %,
Zuckersirup + Glycerin: 13,5 g,
Calciumsalze nicht flüchtiger Säuren: etwa 1 g.

Der durch absoluten Alkohol extrahierte Sirup zeigte alle Pentosenreaktionen ausgeprägt und lieferte ein Phenylosazon, das nach mehrfachem Umkrystallisieren aus Wasser zwar unscharf bei 152° zu schmelzen begann, aber bei der Stickstoffbestimmung den auf ein Pentosazon stimmenden Wert ergab:

0,0216 g bei 22,5° und 758 mm Hg lieferten 3,4 ccm N
= 17,78 % statt der berechneten 17,18 %.

Auch der Calciumgehalt der nicht flüchtigen Säuren entsprach einem Gemisch von Tartronsäure und Trioxyglutarsäure:

0,0374 gaben 0,0122 g CaO = 23,3 % Ca.

Die Resultate dieser chemischen Oxydation sind also qualitativ identisch mit den durch die elektrolytische Oxydation gewonnenen. Auch hier tritt offenbar eine Spaltung des primär gebildeten Glycerinaldehydes mit folgender Synthese der Spaltprodukte in saurer Lösung ein.

III. Die Elektrolyse des Glykols.

Wir führten die Elektrolyse des Glykols genau in der für das Glycerin gewählten Anordnung durch. Auch der Gang der Bearbeitung der Reaktionsflüssigkeit war derselbe. Es war vorauszusehen, daß als Hauptprodukt der Elektrolyse Formaldehyd und dessen Oxydationsprodukte resultieren würden. Auch hier überraschte das Resultat, daß in der schwefelsauren Lösung synthetische Vorgänge einsetzen, die zur Bildung kohlenstoffreicherer Zucker führen. Bei zwei Versuchen, die mit verschiedenen Amp.-Stunden unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, ließen sich Syrupe gewinnen, die Fehlingsche Lösung reduzierten, keine Pentosen, kein Dioxyaceton, keinen Glycerin- und Glykolaldehyd enthielten, aber ein aus Wasser in gelben Nadeln krystallisierendes, bei 184 bis 185° schmelzendes Osazon lieferten. Leider war die Menge des durch mehrfaches Umkrystallisieren gewonnenen Osazons nicht zur Analyse ausreichend, so daß wir es nur durch den Ausschluß der genannten Zuckerarten vermutungsweise als ein Hexosazon

ansprechen können. Der recht scharfe Schmelzpunkt stimmt mit keinem der bekannten Tetrosen überein, wohl aber mit dem bekannter Hexosen. Ohne aber in dieser Richtung einen sicheren Schluß ziehen zu wollen, scheint uns durch die Beobachtung des Osazons der Eintritt synthetischer Vorgänge oder eines Polymerisationsvorganges bewiesen.

Bei einem dritten, unter anscheinend den gleichen Bedingungen angestellten Versuche wurde ein aus Wasser krystallisierendes Osazon in geringer Menge gewonnen, dessen Schmelzpunkt bei 148° lag. Die schlechten Ausbeuten gestatteten nicht, Genaueres zu ermitteln, so daß wir uns auf die Angabe der Beobachtung beschränken. Die in den früheren Mitteilungen charakterisierte Aufgabe mußte uns veranlassen, gerade die in sehr geringer Menge entstehenden Produkte, denen wir als Phasen des ganzen Prozesses eine Bedeutung zuschreiben, ins Auge zu fassen. Selbstverständlich wurden die hierdurch gebotenen experimentellen Vorsichtsmaßregeln peinlich berücksichtigt.

Bezüglich der Bildung des Osazons ist noch zu erwähnen, daß die wässerige Lösung des nach der Extraktion mit absolutem Alkohol von Kalksalzen freien Sirups, der vorwiegend aus unverändertem Glykol bestand, mit essigsaurem Phenylhydrazin mehrere Stunden auf dem Wasserbade erwärmt und sodann durch Filtration von sehr geringen Mengen harziger Ausscheidungen befreit wurde. Bei 12- bis 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur schied sich das Osazon in hellgelben Nädelchen ab.

Unter den flüchtigen Säuren befindet sich neben der Ameisensäure etwas Essigsäure. Sie ließ sich, nachdem ihre Gegenwart durch die Analyse des aus den flüchtigen Säuren gewonnenen Bariumsalzes nahegelegt war, nach Zerstörung der Ameisensäure mit Chromsäure in schwefelsaurer Lösung durch die qualitativen Reaktionen in verschiedenen Versuchen nachweisen.

0,2874 g Bariumsalz gaben 0,2340 g $BaSO_4$.

	Gefunden	Berechnet für $(HCOO)_2Ba$	Berechnet für $(CH_3COO)_2Ba$
Ba =	58,1 %	60,3 %	53,7 %

Merkwürdigerweise entstand Essigsäure nicht bei der Elektrolyse des Traubenzuckers und des Glycerins. Über die Art

Nr.	Zusammensetzung der Anodenlösung	Stromverhältnisse	Formaldehyd	Flüchtige Säuren, hauptsächl. Ameisensäure	Bemerkungen
1	20 g Glykol 50 ccm 5% H_2SO_4	0,5 Amp. 17 Amp.-St.	1,42 g = 7,1%	0,42 g = 2,1% Essigsäure neben Ameisensäure nachgewiesen	8,5 g Sirup, aus dem Osazon Sm. 184 bis 185° gewonnen wurde. Nicht flüchtige Säuren in Spuren
2	„	0,5 Amp. 34 Amp.-St.	2,3 g = 11,5%	1,15 g = 5,75%	3 g Sirup, Osazon daraus Sm. 184°. Nicht flüchtige Säuren in Spuren
3	„	1 Amp. 26,75 Amp.-St.	2,95 g = 9,83%	1,13 g = 3,77%	10 g Sirup. Prüfung auf Dioxyaceton, Glycerinaldehyd, Pentosen, Glykolaldehyd negativ. Nicht flüchtige Säuren: 1 g als Ca-Salze. Ca = 21,58%
4	11,5 g Glykol 50 ccm 5% H_2SO_4	0,5 Amp. 10 Amp.-St.	0,96 g = 8,32%	0,44 g = 3,84% Essigsäure neben Ameisensäure nachgewiesen	2,5 g Sirup. Sehr geringe Mengen Osazon Sm. 148°. 0,5 g nicht flüchtige Säuren (Ca-Salze). Keine Glykolsäure

ihrer Bildung sind verschiedene Deutungen möglich, auf deren Wiedergabe wir bei ihrer ganz hypothetischen Natur verzichten.

Nicht flüchtige Säuren entstehen bei der Elektrolyse des Glykols in äußerst geringer Menge. Sie wurden in der bei den Glycerinversuchen beschriebenen Weise in der Form der Calciumsalze isoliert. Ihr Gehalt an Ca (21,58%) gab über ihre Natur keinen Aufschluß. Die vergeblichen Versuche, ein lösliches Kupfersalz darzustellen, schließen nur (bei der gewählten Dauer der Elektrolysen) mit Sicherheit die Glykolsäure aus.

Die Gasentwicklung ist reichlich, etwa 115 ccm pro Amp.-Std.; es entweicht fast reine Kohlensäure.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Glykol in schwefelsaurer Lösung an einer Bleianode als Hauptprodukte Formaldehyd, Ameisensäure und Kohlensäure liefert, daß daneben in geringem Umfange synthetische Vorgänge aus Formaldehyd oder Glykolaldehyd oder aus beiden Körpern zusammen sich abspielen, welche durch Oxydation Veranlassung geben, zur Bildung geringer Mengen nicht flüchtiger Säuren, die nicht Glykolsäure sind.

Die näheren experimentellen Angaben sind oben tabellarisch zusammengestellt.

Über die Fette im Hühnerei.

Von

Raffaele Paladino.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Kgl. Universität in Neapel.)

(Eingegangen am 28. März 1909.)

Über die chemische Zusammensetzung des Hühnereies sind seit langem vielfach Untersuchungen angestellt, die seine verwickelte Zusammensetzung und seinen großen Nährwert immer mehr bestätigt haben. Trotzdem hat nichts Besonderes hinsichtlich der im Eigelb enthaltenen Fettstoffe festgestellt werden können; deshalb habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Malerba mich mit dem Studium dieser Fette befaßt, um die Natur und chemische Beschaffenheit derselben möglichst genau zu ergründen. In der vorliegenden kleinen Arbeit ist es meine Absicht gewesen, vorläufig nur eine eingehende Beschreibung des von mir beim Studium obengenannter Fette benutzten chemischen Verfahrens darzulegen.

Ich nahm zu diesem Zwecke eine große Menge Hühnereier, und nachdem ich auf dem gewöhnlichen Wege das Gelbe vom Weißen geschieden hatte, wurde ersteres zuerst mit kaltem und dann mit warmem Äther ausgezogen, und zwar so lange, bis der Äther farblos geworden war. Durch dieses mehrfach wiederholte Verfahren erhielt ich ungefähr 200 g einer Fettsubstanz, die nach dem Abdestillieren und Verdampfen des Äthers im Wasserbade orangegelbe Farbe zeigte. Nach längerem Stehen teilte sich dieses Fett in zwei deutlich voneinander geschiedene Schichten von ungleicher Dichte und Färbung, woraus hervorgeht, daß bei dem in Rede stehenden Fett vor allem ein flüssiger und ein fester Bestandteil zu unterscheiden ist. Diese beiden Bestandteile habe ich nun sorgfältig isoliert und einer genaueren Untersuchung unterzogen.

Einleitende Versuche.

Verseifung (nach E. Salkowski).

Einerseits löste ich 50 g der Fettsubstanz in 50 ccm 90%igem Alkohol, andererseits erwärmte ich 15 g Ätzkali mit 10 ccm Wasser und fügte dann 50 ccm 90%igen Alkohol hinzu. Beide Lösungen wurden nun jede für sich bis fast auf den Siedepunkt erhitzt und vereint; durch sofortiges starkes Umschütteln erhielt ich dann eine augenblickliche und vollständige Verseifung. Zu dieser rötlich-gelben Seifenlösung fügte ich darauf nach längerem Stehen reichlich Salzsäure. Dann lies ich das Ganze kochen und filtrierte nach dem Abkühlen ab. Die so erhaltene Flüssigkeit war klar, reagierte sauer und zeigte eine gelbliche Färbung; der auf dem Filter zurückgebliebene Teil stellte sich als eine teigige, dunkelgelbe Masse dar. Diese wusch ich nun wiederholt mit destilliertem Wasser und behandelte sie mit warmem Äther, worin sie sich vollständig auflöste. Diese so erhaltene Ätherlösung war klar, reagierte sauer und zeigte eine rötlich-gelbe Farbe.

Untersuchungen der sauren Flüssigkeit, die durch Filtration und Fällung der Kaliumseifenlösung durch Salzsäure erhalten ist.

Die gelbe, klare, sauer reagierende Flüssigkeit teilte ich in zwei gleiche Teile, um in dem einen das Glycerin, in dem anderen die Phosphorsäure aufzufinden. Nachdem ich den ersteren Teil vollkommen mit Ammoniak neutralisiert hatte, ließ ich langsam bis auf ein kleines Volumen auf dem Wasserbade verdampfen. Während des Einengens änderte sich die Farbe der Flüssigkeit von gelb in bräunlich. Diese Flüssigkeit wurde nun mit absolutem Alkohol behandelt, um das Glycerin auszuziehen, und dann filtriert. Der Alkohol wurde dann auf dem Wasserbade verdampft, und in dem so erhaltenen und verdünnten Rückstande fand ich das Glycerin, das sich durch die gewöhnlichen Reaktionen (mit Kaliumbisulfat usw. durch den charakteristischen Akroleingeruch) zu erkennen gab. — Den anderen Teil der ursprünglichen Flüssigkeit dampfte ich auf dem Wasserbade vollständig ein, versetzte ihn mit heißer Salpetersäure, um die organischen Substanzen zu zerstören, dampfte ein und fügte zu dem Rückstand wenig, durch Salpetersäure angesäuertes Wasser. Die filtrierte Flüssigkeit ließ ich stehen, worauf das entstandene Kaliumnitrat am Boden auskrystallisierte. Die abgegossene, klare, auf 40° erwärmte Flüssigkeit behandelte ich mit einer Lösung von molybdänsaurem Ammoniak in Salpetersäure; es entstand ein reichlicher gelber Niederschlag, der nach 24 Stunden sich noch bedeutend vermehrte und in bekannter Weise in Magnesiumpyrophosphat übergeführt wurde. Beide Versuche bewiesen klar die Anwesenheit erheblicher Mengen Phosphors. Außerdem ergab sich mit Ammoniumrhodanid sowie Ferrocyankalium die Gegenwart von kleinen Mengen Eisen zu erkennen, das jedenfalls vom Lipochrom herrührt.

Untersuchungen des auf dem Filter zurückgebliebenen festen und dann in Äther gelösten Rückstandes nach Zerlegung der Kaliumseife durch Salzsäure.

Die Ätherlösung besaß rötlich-gelbe Färbung und stark saure Reaktion. Der Äther wurde durch Destillation und Verdampfung im Wasserbade vollständig entfernt. Die erhaltene Substanz nahm allmählich eine halbfeste Konsistenz von gelblich-weißer Färbung an; sie wurde dann in einer möglichst geringen Menge Äther gelöst und endlich filtriert. Die Ätherlösung, welche die Fettsäuren enthielt, wurde mit $10^0/_0$igem Ätznatron behandelt, um die Fettsäuren in Seifen überzuführen. Darauf wurde die Mischung in einen Scheidetrichter geschüttet, in welchem sie sich nach einiger Zeit in zwei scharf getrennte Schichten schied, eine wässerige und eine ätherische, die nacheinander abgelassen wurden. Um den Natronüberschuß zu neutralisieren, ließ ich Kohlensäure durch die wässerige Seifenlösung hindurchstreichen und diese dann im Wasserbade vollständig eindampfen. Die so erhaltene und dann pulverisierte und im Trockenschranke vollständig getrocknete Natriumseife löste ich in kochendem Alkohol, und diese noch heiße Mischung wurde durch konzentrierte Bleiacetatlösung niedergeschlagen. So erhielt ich einen reichlichen gelben Bleiseifenniederschlag, den ich auf einem Filter sammelte, mit Wasser wusch und dann vollständig trocknete. Da darin die Anwesenheit von Oleinsäure zu erwarten war, wurde er pulverisiert und mit Äther ausgezogen, um das Bleioleat allein zu lösen. Diese gelbe Ätherlösung des Bleioleats wurde filtriert, und auf dem Filter blieb nun ein fast weißer Teil zurück, den ich wiederholt mit Äther wusch. Darauf wurde der flüssige Teil sowie der Rückstand untersucht.

Untersuchung des flüssigen Teils.

Die Ätherlösung wurde mit verdünnter Salzsäure behandelt, um die Bleiseife zu zerlegen und so die Oleinsäure in Freiheit zu setzen, die im Äther gelöst blieb, während das Chlorblei niederfiel. Nachdem die Ätherlösung im Scheidetrichter abgetrennt war, wurde sie filtriert, dann destilliert und endlich eingedampft, um den Äther ganz zu entfernen. Es blieb nun ein flüssiger, öliger Teil von gelber Farbe und saurer Reaktion zurück, den es mir in keiner Weise, auch nicht durch starke Abkühlung gelang, zum Erstarren zu bringen: er enthielt die von mir vermutete Oleinsäure, die ich dann noch einigen Proben unterwarf, um noch mehr Gewißheit über ihre Natur zu bekommen. Die Pettenkofersche Reaktion fiel stark positiv aus.

Untersuchungen des nicht in Äther gelösten Teils.

Um die anderen an Blei gebundenen Fettsäuren frei zu machen, wurde das Ganze mit verdünnter Schwefelsäure behandelt und eine Zeitlang kochen gelassen. Nach dem Zersetzen und Erkalten der Bleiseife wurde die Mischung filtriert und der Rückstand nach vollständiger

Trocknung auf einem Filter gesammelt, in Äther gelöst und dann filtriert, um so das Bleisulfat von der Ätherlösung der Fettsäuren zu trennen.

Durch nachfolgendes Abdestillieren des Äthers erhielt ich einen flüssigen Rückstand von gelber Farbe, der beim Erkalten in eine feste weiße Masse überging, die zur Feststellung des Schmelzpunktes einer vorhergehenden Reinigung bedurfte. Diese erzielte ich durch wiederholtes Umkrystallisieren aus kochendem Alkohol, bis ich eine weiße krystallinische Substanz bekam, die bei 62° C schmolz und die entweder Palmitinsäure allein oder vermischt mit Stearinsäure sein konnte. Um über die Anwesenheit von Stearinsäure Aufschluß zu erhalten, löste ich die ganze feste, fast weiße Masse der Fettsäuren in Äther und versetzte diese Ätherlösung mit 10%iger Natronlauge. Dann erfolgte die Trennung der Seifenlösung von der Ätherschicht. Durch die wässerige Seifenlösung ließ ich Kohlensäure strömen, um den Laugenüberschuß zu neutralisieren und verdampfte dann bis zur Trockne. Der Seifenrückstand wurde pulverisiert und in kochendem Alkohol gelöst. Die Alkohollösung wurde nun mit gesättigter Chlorbariumlösung behandelt und dann filtriert, um den Niederschlag zu sammeln. Der Niederschlag wurde mit kochendem Alkohol gewaschen und dann in wenig verdünnter Salzsäure gelöst, worauf ich noch Äther hinzufügte. Die abgetrennte Ätherlösung verdampfte ich auf dem Wasserbade, der Rückstand wurde dann in kochendem Alkohol gelöst, aus dem beim Erkalten sich nun eine weiße Substanz abschied, die dann ihrerseits wieder in Alkohol gelöst und aus demselben umkrystallisiert wurde. Die Substanz schmolz bei 69 bis 70° C, sie bestand aus Stearinsäure. Dadurch ist die Anwesenheit der Olein-, Palmitin- und Stearinsäuren im Hühnerfett sicher bewiesen.

Es ist nun die Frage, ob außer den vorerwähnten Säuren auch die Gegenwart flüchtiger Säuren nachzuweisen ist. Hierzu war es nötig, die Abtrennung der flüchtigen Säuren zu versuchen, die allerdings bis jetzt noch niemanden richtig gelungen war wegen der verschiedenen mit dem Verfahren verbundenen Schwierigkeiten. Es war mir möglich, nicht nur die Anwesenheit von flüchtigen Säuren nachzuweisen, sondern auch eine Abtrennung der Ameisensäure zu erreichen und zwar durch Behandlung eines Teils des erhaltenen Destillates mit Ammoniak und Silbernitrat, wie aus dem folgenden hervorgeht.

Die von Liebig angewendete und von mir ebenfalls befolgte Methode zur Gewinnung der flüchtigen Fettsäuren gründet sich auf die fraktionierte Absättigung dieser Säuren. Die wässerige Lösung der flüchtigen Säuren, die dadurch erhalten wird, daß man das Fett verseift und die Fettsäuren dann durch Schwefelsäure freimacht, wird im Wasserdampfstrome destilliert, und das Destillat, in dem sich die flüchtigen Fettsäuren vorfinden, wird in zwei gleiche Teile geteilt. Von diesen wird der eine vollkommen mit Ätzkali neutralisiert und dann mit dem andern wieder vereinigt; die so erhaltene Mischung wird von neuem destilliert. Dabei gehen die Säuren, die einen niedrigen Siedepunkt haben, ins Destillat über, während diejenigen, die einen höheren Siedepunkt besitzen, als Kalisalze im Kolben zurückbleiben.

Durch wiederholtes Behandeln der Säuren, seien sie nun ins Destillat übergegangen oder seien sie als Alkalisalze noch im Kolben, immer auf dieselbe Weise, d. h. durch teilweise Sättigung und folgende Destillation, erhält man kleine Mengen der reinen flüchtigen Säuren. Wie bekannt, führt die Liebigsche Methode zu einer befriedigenden Trennung. Bei Wiederholung dieser Methode gelang es mir, unter den flüchtigen Säuren nur die Anwesenheit der Ameisensäure nachzuweisen, und zwar durch die charakteristische Reduktion des Silbernitrats nach Sättigung eines Teils des erhaltenen Destillats mit Ammoniak.

Um meine Studien über die im Hühnerei enthaltenen Fette zu vervollständigen, habe ich auch das Lutein oder gelbe Pigment des Fettes einer Untersuchung unterzogen. Das scheint mir von einigem Interesse zu sein, da es mir gelungen ist, das Lutein nach der von Staedeler und Holm für das Lutein der Corp. luteä der Kühe angegebenen Weise zu isolieren und in krystallisierter Form zu erhalten, indem ich das Eigelb mit Chloroform auszog und die gelbe Lösung bei gewöhnlicher Temperatur verdampfen ließ. Die nach langem Stehen erhaltenen nadelförmigen Krystalle können durch Waschen mit Alkohol und Äther gereinigt werden. Sie sind im Wasser nicht, in Äther und Chloroform dagegen leicht löslich. Die Luteinlösung absorbiert das blaue und violette Licht sehr stark. Nachdem man diese Lösung mit Alkohol und Äther verdünnt hat, weist das Spektrum zwei Absorptionsstreifen auf, von denen der eine in der Nähe der Linie F, der andere zwischen F und G liegt.

Zusammenfassung.

I. Der Fettanteil des Eies besteht aus einer Mischung von festem und flüssigem Fett. Das feste Fett herrscht vor, es zeigt hellgelbe Farbe. Das flüssige Fett sieht ölig aus und ist von dunkel orangegelber Farbe; im Spektroskop zeigt es einen breiten Streifen, der das Grün, das Blau und das Violett absorbiert.

II. An der Zusammensetzung sowohl des festen als auch des flüssigen Fettes beteiligen sich die Olein-, die Palmitin- und die Stearinsäure, außerdem in erheblicher Menge Phosphorsäure; ferner sind Schwefel und Eisen zugegen.

III. In dem untersuchten Fett fehlen die flüchtigen Säuren nicht; es war allerdings nur möglich, die Anwesenheit der Ameisensäure nachzuweisen.

IV. Das Lipochrom des untersuchten Fettes kann man in charakteristischen gelben Nadeln krystallisiert erhalten.

Über die Wirkung anorganischer Kolloide auf die Autolyse.

Von

M. Ascoli und G. Izar.

(Aus dem Institute für spezielle Pathologie innerer Krankheiten der Kgl. Universität zu Pavia.)

6. Mitteilung.

Wirkungsdifferenzen zwischen den verschiedenen Hydrosolen.

Von

G. Izar.

(Eingegangen am 28. März 1909.)

Mit 13 Figuren im Text.

In den vorigen Aufsätzen wurde die Wirkung nachgewiesen, welche einige Metallhydrosole auf die Gesamtautolyse und auf die Spaltung der Nucleine ausüben.

Nun schien es uns angezeigt, solche Untersuchungen auf andere nach der Bredigschen Methode hergestellte anorganische Kolloide auszudehnen und zu erforschen, auf welche Produkte der Autodigestion die größere Zunahme des nicht koagulierbaren Stickstoffes zurückzuführen ist.

Wir stellten uns ferner die Aufgabe, festzustellen, ob diese Kolloide auf die verschiedenen Fermentwirkungen, aus welchen der autolytische Prozeß besteht, einen gleichen Einfluß ausüben, oder ob die einzelnen Kolloide verschiedene, von den Eigenschaften des betreffenden Metalls abhängende Unterschiede aufweisen.

Die diesbezüglichen Versuche wurden nach folgender Methode ausgeführt: Von der Leber eines frisch geschlachteten Kalbes wurde eine gewisse Menge durch die Fleischmaschine geschickt und durch ein Sieb getrieben. Der so erhaltene Brei wurde gründlich umgerührt; dann wurden je 50 g desselben nach Zusatz von H_2O bis zum Gesamtvolumen

von 500 ccm auf verschiedene vorher sterilisierte Gefäße verteilt, welche sorgfältig verschlossen wurden.

In einer der Proben wurden die Eiweißstoffe sofort koaguliert und sowohl der Gesamtstickstoff wie die verschiedenen Stickstofffraktionen bestimmt. Den anderen Proben wurde destilliertes H_2O und verschiedene Kolloidmengen, bis zu einem Gesamtvolumen von 500 ccm, und außerdem, um Fäulnis zu vermeiden, 1 % Toluol beigemengt, wonach die Mischungen in einen Brutschrank bei 37 bis 38° C der Autolyse 72 Stunden lang überlassen und während dieser Zeit wenigstens 6 mal in je 24 Stunden tüchtig durchgeschüttelt wurden.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Inhalt der Kolben in Porzellanschalen geschüttet und die Gläser mit so viel destilliertem Wasser nachgespült, daß ein Gesamtvolumen von 600 ccm erreicht wurde; diesem Gemische wurde 1 % Dikaliumphosphat zugesetzt und danach das Ganze 5 Minuten gekocht.

Die Proben wurden nach Abkühlung durch Zusatz von destilliertem Wasser auf das ursprüngliche Volumen gebracht und durch dickes Papier filtriert; dann wurden 450 ccm des Filtrates im Wasserbade auf weniger als 250 ccm eingedampft und nach Abkühlung und nochmaliger Filtration wieder auf dieses Volumen durch Zusatz von destilliertem Wasser gebracht.

In 25 ccm dieser Flüssigkeit wurde der Stickstoff in zwei Parallelversuchen nach Kjeldhal bestimmt, wobei das übergegangene NH_3 durch $^n/_{10}$-H_2SO_4 mit Rosolsäure als Indicator titriert wurde.

Weitere 50 ccm der obigen Flüssigkeit wurden mit 10 ccm HCl und Phosphor-Wolframsäure in 10 %iger Lösung bis zur vollständigen Fällung versetzt; das Ganze wurde durch Zusatz von destilliertem Wasser auf 150 ccm gebracht und durch dickes Papier filtriert. In 50 ccm des Filtrates wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeldhal bestimmt.

In weiteren 100 ccm wurden die Purinbasen nach Salkowski bestimmt.

Zuletzt wurde in 50 ccm die Albumosen nach Baumann und Bömer (1), d. h. in der Weise bestimmt, daß nach Ansäuerung durch H_2SO_4 bis zu einer Acidität von 0,4 %, pulverförmiges Zinksulfat bis zur Sättigung zugesetzt, nach 24 Stunden filtriert wurde; der Filterrückstand wurde mit gesättigter Zinksulfatlösung gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich der Stickstoff in dem Filterinhalt nach Kjeldhal bestimmt.

Alle die erhaltenen Zahlen wurden auf das ursprüngliche Volumen von 600 ccm, d. h. auf 50 g Leberbrei umgerechnet. Es wurden somit folgende Werte bestimmt:

1. Gesamt-N,
2. Monoaminosäuren-N,
3. Purinbasen-N,
4. Albumosen-N.

Aus der Differenz zwischen der gesamten Stickstoffmenge und der Summe der übrigen Werte (2, 3, 4) ergab sich die Menge der in Form

von Diaminosäuren, von Ammoniak und von Pepton vorhandenen Stickstoffes.

Die bei meinen Untersuchungen angewendeten metallischen Hydrosole von Ag, Pt, Au, Pd, Ir, Cu, Fe, Pb wurden von mir selbst nach der Bredigschen Methode und mit Einhaltung der in den früheren Mitteilungen angegebenen Maßregeln hergestellt; diejenigen des $Fe(OH)_3$, As_2S_3, MnO_2, $Al_6O_{14}H_{10}$ nach der für jedes einzelne angegebenen Methode. Alle die auf chemischem Wege bereiteten Hydrosole wurden dann lange gegen destilliertes Wasser dialysiert. Von jedem Präparat wurde der Metallgehalt dadurch bestimmt, daß nach Verbrennung der zur Stabilisierung des Hydrosols zugesetzten organischen Substanzen (Gelatine) das Metall in Form seines Oxyds gewogen wurde. Diese Methode konnte natürlich nicht zur Bestimmung des Hg, des Pb und des As angewendet werden; bei diesen Kolloiden wurde die quantitative Bestimmung in Form von Salzen oder durch einfache Wägung nach Trocknung im Wasserbade und darauffolgendem 48stündigem Verweilen im H_2SO_4-Exsiccator vorgenommen.

Für das Hg wendete ich auch die Rebièresche (2) Methode an; die dabei erzielten Resultate waren nicht merklich von denjenigen verschieden, welche ich mit den zwei anderen Methoden erhielt.

In den eine katalytische Wirkung auf die Spaltung des H_2O_2 besitzenden Hydrosolen wurde auch der katalytische Wert K nach Bredigs Methode bestimmt.

Die Hydrosole mit negativ-elektrischer Ladung wurden in der Mehrzahl der Fälle — wie aus dem Protokoll der einzelnen Versuche hervorgeht — durch Gelatine (3 ccm einer 48 Stunden lang gegen fließendes Wasser und 24 Stunden lang gegen destilliertes Wasser dialysierten $1\,^0/_0$igen Lösung von Gelatine Merck auf 100 ccm des Hydrosols) stabilisiert; diejenigen mit positiver Ladung wurden direkt angewendet. Jedoch habe ich, in der Befürchtung, daß die kleinen Gelatinemengen an und für sich den autolytischen Prozeß befördern könnten, Kontrollversuche ausgeführt mit gleichen Mengen desselben, aber nicht stabilisierten Kolloids; aus den, wie aus den Tabellen ersichtlich, übereinstimmenden Resultaten geht aber hervor, daß die geringen Gelatinemengen, welche benutzt wurden, die Leberautolyse

keineswegs beeinflussen und daß, wie schon in einer anderen Arbeit nachgewiesen wurde (3), die Hydrosole auf die Leberautolyse mehr oder weniger die gleiche Wirkung ausüben, sei es, daß sie nicht stabilisiert oder stabilisiert verwendet werden.

Silber,
hergestellt nach Bredig. Gehalt an Metall 0,0385 %;

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} = 0{,}0367, \text{ wobei } t = 45', T = 37°$$

[vgl. Bredig (17)].

Tabelle I.

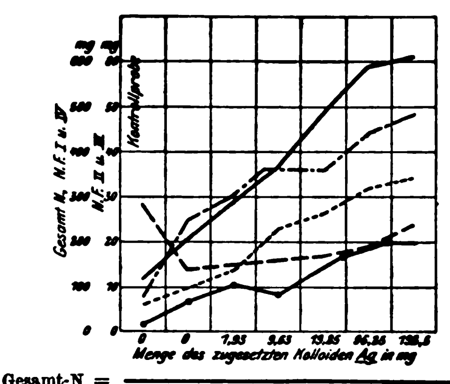
Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Ag-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,160	0,083	0,042	0 011	0,024
72	500	—	—	0,277	0,133	0,019	0,034	0,091
72	495	5	1,925	0,384	0,182	0,020	0,039	0,143
72	475	25	9,625	0,490	0,308	0,022	0,048	0,112
72	450	50	19,25	0,653	0,350	0,023	0,048	0,232
72	250	250	96,25	0,787	0,430	0,026	0,059	0,272
72	250	250*	96,25	0,571	0,252	0,022	0,059	0,238

* nicht stabilisiert.

Tabelle II.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Ag-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Ag-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,120	0,062	0,029	0,008	0,021
72	500	—	—	0,208	0,100	0,014	0,025	0,069
72	495	5	1,925	0,288	0,137	0,015	0,030	0,106
72	475	25	9,625	0,368	0,231	0,016	0,036	0,085
72	450	50	19,25	0,489	0,263	0,017	0,036	0,173
72	250	250	96,25	0,590	0,323	0,019	0,044	0,204
72	250	250*	96,25	0,428	0,189	0,016	0,044	0,179
72	—	500	192,5	0,610	0,340	0,024	0,048	0,198
72	—	500*	192,5	0,570	0,260	0,020	0,048	0,244

* nicht stabilisiert.



Gesamt-N = ————————————————

F. I = Monoaminosäuren-N = — — — — — — — — — —

F. II = Albumosen-N = —— —— —— —— —— ——

F. III = Purinbasen-N = ·——·——·——·——·

F. IV = Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N = ·——·——

Kontrollprobe = sofort koaguliert. — Alle übrigen 72 St. autolysiert.

Kurve 1.

Dieses Kolloid übt, wie aus den obigen Tabellen und Kurven hervorgeht, auch bei ziemlich großen Metallmengen (0,192 g) eine beschleunigende Wirkung sowohl auf die Gesamtautolyse wie auf die Spaltung der Nucleine und auf die Bildung der Mono- und Diaminosäuren aus. Bezüglich der Bildung der Purinbasen müssen wir dagegen hervorheben, daß, wie bereits in einer früheren Mitteilung nachgewiesen wurde (4), während die Spaltung der Nucleine durch die Anwesenheit des Silberhydrosols sehr befördert wird, dasselbe nicht für den weiteren Oxydationsprozeß der entstandenen Harnsäure gilt, welcher, wie wir aus den Arbeiten von G. Ascoli (5), Schittenhelm (6), Burian (7), W. Jones (8), Wiener (9) u. a. m. wissen, sich in der der Autolyse unterworfenen Kalbsleber unter normalen Verhältnissen abspielt. Das Silberhydrosol scheint in der Tat eine hemmende Wirkung auf dieses uricolytische Ferment auszuüben. Deshalb müßte man von Fraktion 2 (Purinbasen-N) die gebildete, aber nicht zerstörte $\bar{U}$-N-Menge abziehen, um die Menge des Stickstoffes zu ermitteln, welcher ausschließlich durch die Wirkung des Hydrosols auf die Spaltung der Nucleine erzeugt wird.

Bezüglich der Albumose müssen wir erwähnen, daß die Menge derselben bei Anwendung der bereits angegebenen Versuchs- und Bestimmungsmethoden infolge der einfachen Autolyse abnimmt. Zu ähnlichen Resultaten gelangten Drjewezki (10) und Preti (11).

Diese Erscheinung erklärt Drjewezki durch die spurweise Anwesenheit von Nucleoproteiden in dem Niederschlage, welcher sich bei der Behandlung der Flüssigkeit mit Zinksulfat bildet Nucleoproteiden, welche sich der Fällung durch Erhitzen bei Gegenwart von Essigsäure entzogen hätten. Bei meinen Versuchen habe ich, wie gesagt, zur Gerinnung der Eiweißstoffe die Methode von Embden und Knop (12) angewendet; die Millonsche und die Xanthoprotein-Reaktion mit dem durch Sättigung der Flüssigkeit mit Zinksulfat erhaltenen und dann nach Drjewzkis Methode behandelten Niederschlag fielen immer negativ aus, während die Biuretreaktion immer positiv war.

Bei den Versuchen mit Zusatz von Kolloid nahm die Menge der Albumosen stets proportional zur wachsenden Menge des zugesetzten Kolloids zu, ohne jedoch auch bei hohen Dosen die Mengen zu erreichen, welche vorher bei den Kontrollversuchen nachgewiesen wurden. Die Tatsache, daß nach der Autolyse geringere Albumosenmengen nachgewiesen wurden, ließ sich vielleicht durch eine nachträgliche Umwandlung dieses Körpers in einfachere Produkte erklären; nach dieser Annahme würde das Silberhydrosol, wenigstens bei den experimentierten Dosen, nur eine hemmende Wirkung auf diesen Zersetzungsprozeß entfalten.

Platin,

hergestellt nach Bredig. Gehalt an Metall 0,043 %; K = 0,0497.

Tabelle III.

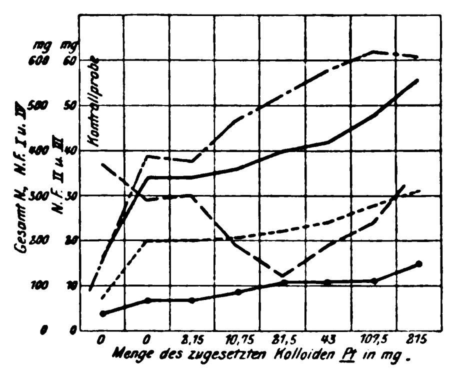
Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Pt-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Pt-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,212	0,092	0,045	0,017	0,058
72	500	—	—	0,397	0,244	0,028	0,049	0,076
72	495	5	2,15	0,402	0,239	0,026	0,051	0,086
72	475	25	10,75	0,414	0,255	0,017	0,060	0,082
72	450	50	21,5	0,447	0,271	0,013	0,067	0,096
72	400	100	43,0	0,473	0,294	0,014	0,071	0,094
72	250	250	107,5	0,509	0,303	0,021	0,075	0,110
72	—	500	215,0	0,599	0,365	0,029	0,074	0,131
72	—	500*	215,0	0,574	0,362	0,031	0,078	0,103

* nicht stabilisiert.

Tabelle IV.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Pt-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Pt-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,164	0,074	0,037	0,009	0,044
72	500	—	—	0,340	0,204	0,029	0,039	0,068
72	495	5	2,15	0,342	0,204	0,030	0,038	0,070
72	475	25	10,75	0,369	0,214	0,019	0,047	0,089
72	450	50	21,5	0,407	0,224	0,012	0,052	0,119
72	400	100	43,0	0,429	0,240	0,019	0,058	0,112
72	250	250	107,5	0,480	0,280	0,024	0,062	0,114
72	—	500	215,0	0,564	0,319	0,032	0,061	0,152
72	—	500*	215,0	0,532	0,312	0,033	0,060	0,127

* nicht stabilisiert.



Kurve 2.

Die von diesem Kolloid entfaltete Wirkung ist, sowohl in bezug auf die Gesamtautolyse wie auf die Bildung der Purinbasen und der Mono- und Diaminosäuren, mit derjenigen des Silbers identisch. Dagegen ist die Wirkung auf die Bildung der Albumosen eine etwas andere. Wie aus den Tabellen und Kurven ersichtlich ist, nimmt die Menge der Albumosen zuerst, unter der Wirkung von kleinen Dosen von Platinhydrosol, bis zu einem Minimum, bei mittleren Dosen (zirka 0,02 g Pt) ab; mit dem Steigen der Metallmenge nahm sie dann allmählich zu, bis sie ein Maximum erreichte, welches etwas

niedriger war als die zu Anfang des Kontrollversuches gefundene Albumosenmenge. Durch dieses Verhalten gegenüber den Albumosen nähert sich das Platinhydrosol anderen anorganischen Hydrosolen, wie Ir, Pb usw., welche auch in bezug auf die Gesamtautolyse und auf ihre Fraktionen einen ähnlichen Wirkungsmechanismus aufweisen. Dieses Verhalten legt die Vermutung nahe, daß auch dieses Hydrosol ähnlich wie die anderen, mit denen es zahlreiche Berührungspunkte hat, in sehr starken Dosen eine hemmende Wirkung sowohl auf die Gesamtautolyse wie auf ihre Fraktionen ausüben würde; dies konnte aber wegen der Unmöglichkeit, stabile Hydrosole mit viel höherem Metallgehalt herzustellen, nicht nachgewiesen werden.

Die Abnahme der Albumosenmenge unter der Wirkung derjenigen Hydrosoldosen, welche den stärksten Einfluß auf die verschiedenen Oxydations- und Spaltungsprozesse ausüben, aus deren Komplex der autolytische Prozeß besteht, würde vielleicht die bereits angeführte Hypothese von einer Umwandlung der Albumosen in einfachere Produkte und unseren und anderer Autoren Befund, von einer konstanten Abnahme der Albumosen während des autolytischen Prozesses bestätigen.

Gold,

hergestellt nach Bredig. Gehalt an Metall 0,029%; K = 0,0157.

Tabelle V.

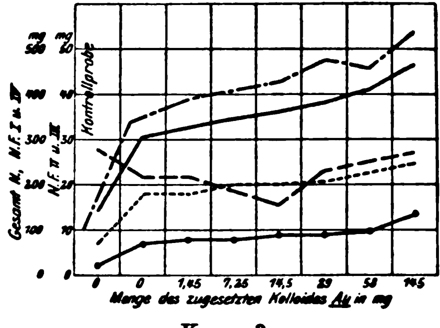
Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Au-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Au-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,160	0,070	0,047	0,013	0,030
72	500	—	—	0,380	0,227	0,028	0,041	0,084
72	495	5	1,45	0,382	0,225	0,029	0,040	0,088
72	475	25	7,25	0,386	0,229	0,024	0,045	0,088
72	450	50	14,5	0,411	0,257	0,017	0,056	0,081
72	400	100	29,0	0,437	0,269	0,019	0,058	0,091
72	300	200	58,0	0,469	0,278	0,029	0,060	0,101
72	—	500	145,0	0,507	0,300	0,036	0,064	0,107
72	—	500*	145,0	0,486	0,290	0,035	0,061	0,100

* nicht stabilisiert.

Tabelle VI.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Au-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Au-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,148	0,075	0,038	0,010	0,025
72	500	—	—	0,316	0,182	0,022	0,034	0,078
72	495	5	1,45	0,328	0,185	0,022	0,039	0,082
72	475	25	7,25	0,350	0,207	0,019	0,041	0,083
72	450	50	14,5	0,364	0,209	0,016	0,043	0,096
72	400	100	29,0	0,380	0,218	0,023	0,048	0,091
72	300	200	58,0	0,410	0,231	0,025	0,046	0,108
72	—	500	145,0	0,479	0,252	0,027	0,054	0,146
72	—	500*	145,0	0,454	0,230	0,025	0,052	0,147

* nicht stabilisiert.



Kurve 3.

Das Verhalten dieses Hydrosols ähnelt durchweg demjenigen des Pt. Die Zunahme sowohl des Gesamt-N wie des Purinbasen-N und der Mono- und Diaminosäuren steht in direktem Verhältnis zur Erhöhung der zugesetzten Hydrosolmenge. Der Albumosen-N nimmt zuerst beim Steigen der Metallmenge, bis zu einem Minimum bei etwa 15 mg Au ab, wonach er, bei höheren Dosen, wieder zunimmt.

Palladium,
hergestellt nach Bredig. Gehalt an Metall 0,0267 %; K = 0,0603.

Tabelle VII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Pd-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Pd-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,127	0,042	0,051	0,009	0,025
72	500	—	—	0,282	0,169	0,030	0,038	0,045
72	495	5	1,335	0,280	0,174	0,021	0,042	0,043
72	475	25	6,675	0,309	0,189	0,016	0,052	0,052
72	450	50	13,35	0,347	0,211	0,011	0,060	0,065
72	400	100	26,7	0,369	0,219	0,009	0,068	0,073
72	250	250	66,75	0,398	0,230	0,027	0,065	0,076
72	—	500	133,5	0,407	0,231	0,038	0,061	0,077
72	—	500*	133,5	0,394	0,224	0,039	0,065	0,064

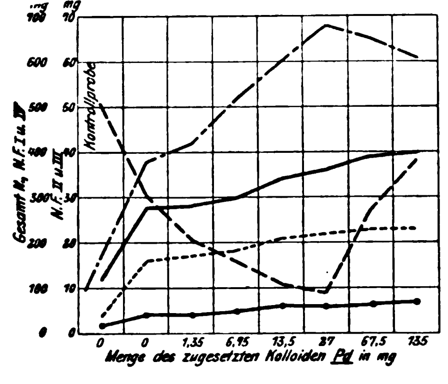
*) nicht stabilisiert.

Tabelle VIII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Pd-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Pd-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,154	0,063	0,041	0,007	0,043
72	500	—	—	0,302	0,180	0,027	0,046	0,049
72	495	5	1,335	0,308	0,180	0,022	0,049	0,057
72	475	25	6,675	0,346	0,214	0,014	0,059	0,059
72	450	50	13,35	0,364	0,217	0,009	0,063	0,087
72	400	100	26,7	0,412	0,240	0,011	0,064	0,097
72	250	250	66,75	0,439	0,248	0,024	0,069	0,098
72	—	500	133,5	0,464	0,245	0,032	0,060	0,127
72	—	500*	133,5	0,450	0,248	0,037	0,062	0,103

* nicht stabilisiert.

Auch für dieses Hydrosol gilt dasselbe, was wir in bezug auf den Gesamt-N, auf den N der Mono- und Diaminosäuren und der Albumosen über die Pt- und Au-Hydrosole gesagt haben. Von diesen unterscheidet es sich dagegen in bezug auf den Purinbasen-N, welcher mit dem Steigen der Hydrosolmenge bis zu einem gewissen Maximum zunimmt, aber, wenn dieses erreicht ist, mit dem Steigen der Kolloidmenge wieder abnimmt.



Kurve 4.

Da wir aus denselben Gründen, welche wir bezüglich des Pt-Hydrosols angeführt haben, keine Pd-Hydrosole mit höherem Metallgehalt gewinnen konnten, war es uns nicht möglich festzustellen, ob diese hemmende Wirkung bei höheren Dosen auch auf die übrigen Fraktionen ausgeübt wurde, wie es bei allen anderen Hydrosolen der Fall ist, mit welchen wir uns im folgenden beschäftigen werden.

Kupfer,

hergestellt nach **Bredig**. Gehalt an Metall 0,022 %; K = 0,0093.

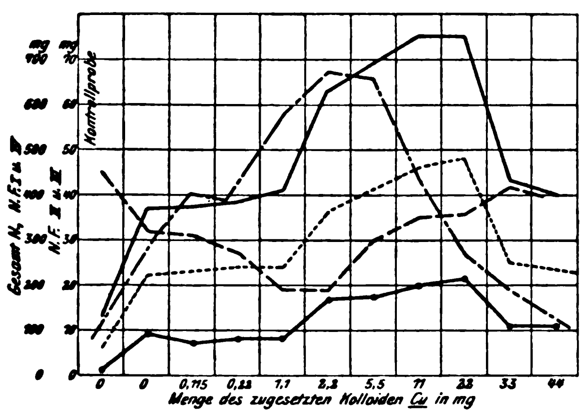
Tabelle IX.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Cu-Hydrosol (nicht stabilisiert) ccm	Cu-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoamino-säuren-N g	Purinbasen-N g	Albumosen-N g	Diamino-säuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,139	0,071	0,011	0,043	0,014
72	500	—	—	0,395	0,288	0,060	0,023	0,025
72	499	1	0,22	0,439	0,324	0,064	0,016	0,035
72	495	5	1,1	0,487	0,333	0,080	0,012	0,065
72	490	10	2,2	0,543	0,350	0,087	0,013	0,093
72	475	25	5,5			verloren		
72	450	50	11,0	0,580	0,416	0,080	0,020	0,064
72	425	75	16,5	0,592	0,396	0,065	0,022	0,109
72	400	100	22,0	0,598	0,413	0,057	0,032	0,096
72	250	250	55,0	0,497	0,352	0,048	0,041	0,056
72	100	400	88,0	0,367	0,278	0,016	0,044	0,029

Tabelle X.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Cu-Hydrosol (nicht stabilisiert) ccm	Cu-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoamino-säuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diamino-säuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,129	0,064	0,045	0,008	0,012
72	500	—	—	0,373	0,220	0,032	0,031	0,090
72	500	0,5	0,11	0,377	0,229	0,031	0,040	0,077
72	499	1	0,22	0,389	0,240	0,027	0,039	0,083
72	495	5	1,1	0,411	0,247	0,019	0,058	0,087
72	490	10	2,2	0,632	0,369	0,019	0,067	0,177
72	475	25	5,5	0,691	0,418	0,030	0,066	0,177
72	450	50	11,0	0,750	0,469	0,035	0,044	0,202
72	400	100	22,0	0,756	0,480	0,036	0,027	0,213
72	350	150	33,0	0,436	0,258	0,042	0,019	0,117
72	300	200	44,0	0,400	0,236	0,040	0,011	0,119

Auch dieses nicht leicht herzustellende und noch schwieriger zu konservierende (schon nach wenigen Stunden bildet sich ein Niederschlag) Hydrosol übt auf die Leberautolyse eine zuerst befördernde und dann hemmende Wirkung aus.



Kurve 5.

Auch kleine Mengen des Metalls im kolloidalen Zustande (0,00022 g Cu) entfalten schon eine ausgesprochene Wirkung, welche allmählich stärker wird, bis sie bei etwa 0,022 g Cu ein Maximum erreicht, nach welchem die befördernde Wirkung wieder

allmählich abnimmt, um zuletzt einer hemmenden Wirkung Platz zu machen. Wenn man die Kurve der verschiedenen Fraktionen betrachtet, so sieht man, daß die Menge Hydrosol, welche die stärkste befördernde Wirkung auf die Spaltung der Nucleine ausübt, sehr verschieden von derjenigen ist, welche den günstigsten Einfluß auf die Gesamtautolyse und auf die Bildung der Mono- und Diaminosäuren ausübt. Während nämlich 100 ccm Cu-Hydrosol, 0,022 g Metall enthaltend, das Optimum der Gesamt-Autolyse darstellen, erhält man schon mit 25 ccm des Hydrosols (= 0,0055 g Cu) das Optimum für die Bildung von Purinbasen, und wenn man diese Dosis überschreitet, so sinkt die Menge der entstandenen Purine allmählich herab, bis sie bei 100 ccm des Hydrosols niedriger als die bei dem Kontrollversuch entstandene Menge wird.

Denselben Unterschied beobachtet man auch in bezug auf die Albumosen, bei welchen das Optimum einer Minimaldosis von 10 ccm Hydrosol (= 0,0022 g Cu) entspricht.

Iridium,

hergestellt nach Bredig. Gehalt an Metall 0,0221 %; K = 0,0219.

Tabelle XI.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Ir-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Ir-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,120	0,062	0,029	0,008	0,021
72	500	—	—	0,208	0,120	0,014	0,025	0,049
72	495	5	1,1	0,311	0,159	0,015	0,029	0,108
72	475	25	5,5	0,407	0,184	0,015	0,030	0,178
72	450	50	11	0,519	0,266	0,016	0,033	0,204
72	250	250	55	0,227	0,124	0,015	0,011	0,077
72	250	250*	55	0,220	0,127	0,015	0,009	0,069
72	—	500	110	0,119	0,072	0,025	0,009	0,013
72	—	500*	110	0,115	0,065	0,023	0,009	0,018

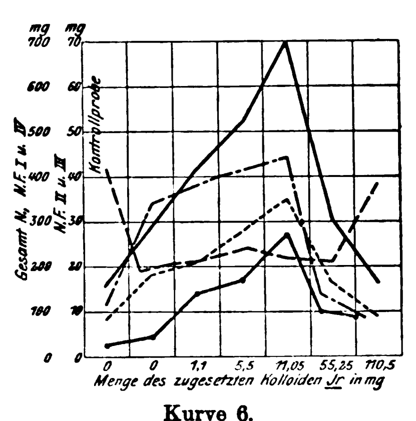
* nicht stabilisiert.

Tabelle XII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Ir-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Ir-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,160	0,083	0,042	0,011	0,024
72	500	—	—	0,277	0,183	0,019	0,034	0,041
72	495	5	1,1	0,415	0,211	0,021	0,039	0,143
72	475	25	5,5	0,508	0,280	0,024	0,041	0,163
72	450	50	11	0,692	0,354	0,022	0,044	0,272
72	250	250	55	0,303	0,165	0,021	0,014	0,103
72	250	250*	55	0,290	0,157	0,022	0,014	0,097
72	—	500	110	0,164	0,092	0,038	0,009	0,025
72	—	500*	110	0,159	0,087	0,036	0,011	0,025

* Nicht stabilisiert.

Das Ir-Hydrosol hat eine metallschwarze Farbe, ist schwer herzustellen, aber sehr stabil. Seine Wirkung unterscheidet sich von derjenigen der anderen Kolloide dadurch, daß es in kleinen Dosen die Albumose nicht beeinflußt; erst bei verhältnismäßig großen Dosen (0,055 g Ir) steigt die Menge der Albumosen fast bis zu der Höhe, welche sie in der Leber vor der Autolyse aufweist.



Kurve 6.

Die übrigen Fraktionen weisen in bezug auf die Wirkung des Hydrosols keinen Unterschied unter sich auf, und ihr Verhalten weicht auch nicht von demjenigen des Gesamt-N ab. Man

Eisen,

hergestellt nach **Bredig**. Gehalt an Metall { I. Präparat 0,0063 % ; II. „ 0,025 % }

Das Fe-Hydrosol ist rubinrot, sehr instabil.

Tabelle XIII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Fe-Hydrosol (nicht stabilisiert) ccm	Fe-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoamino-säuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diamino-säuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,114	0,052	0,049	0,007	0,006
72	500	—	—	0,246	0,139	0,029	0,038	0,040
72	490	10	0,63	0,270	0,158	0,009	0,047	0,056
72	475	25	1,58	0,286	0,164	0,008	0,052	0,062
72	450	50	3,15	0,283	0,160	0,022	0,047	0,051
72	400	100	6,3	0,300	0,167	0,028	0,035	0,070
72	350	150	9,45	0,303	0,180	0,029	0,023	0,071
72	300	200	12,6	0,310	0,184	0,037	0,011	0,078
72	250	250	15,75	0,330	0,191	0,036	0,012	0,091
72	150	350	22,05	0,364	0,209	0,035	0,013	0,107
72	—	500	31,5	0,543	0,331	0,039	0,009	0,164

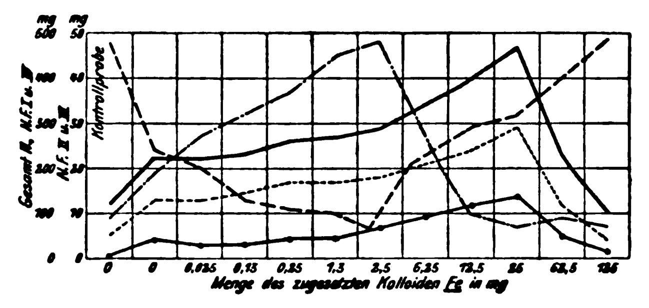
Tabelle XIV.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Fe-Hydrosol (nicht stabilisiert) ccm	Fe-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoamino-säuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diamino-säuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,122	0,054	0,048	0,009	0,011
72	500	—	—	0,222	0,133	0,024	0,019	0,046
72	500	0,1	0,025	0,221	0,138	0,020	0,027	0,036
72	499,5	0,5	0,125	0,232	0,149	0,013	0,032	0,038
72	499	1	0,25	0,264	0,170	0,011	0,037	0,046
72	495	5	1,25	0,275	0,172	0,010	0,045	0,048
72	490	10	2,5	0,293	0,183	0,007	0,048	0,075
72	475	25	6,25	0,347	0,210	0,021	0,021	0,095
72	450	50	12,5	0,403	0,243	0,029	0,010	0,121
72	400	100	25,0	0,472	0,292	0,032	0,007	0,141
72	250	250	62,5	0,235	0,129	0,040	0,009	0,057
72	—	500	125	0,119	0,049	0,049	0,007	0,014

erreicht das Optimum bei 50 ccm des Hydrosols (= 0,011 g Ir); die hemmende Wirkung beginnt, wenn man die Dosis von 0,055 g überschreitet.

Die zwei Versuche, bei welchen Präparate mit einem sehr verschiedenen Metallgehalt angewendet wurden, lassen deutlich den Wirkungsmechanismus dieses Kolloids erkennen.

Die ein Optimum für die Purinbasen und für die Albumosen darstellenden Mengen des Fe-Hydrosols sind identisch; dagegen steht die Menge bedeutend unter derjenigen, welche das Optimum für die Mono- und Diaminosäuren und für den Gesamt-N darstellt.



Kurve 7.

Tabelle XV.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	$Fe(OH)_3$-Hydrosol ccm	Fe-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,147	0,067	0,049	0,011	0,029
72	500	—	—	0,309	0,194	0,021	0,045	0,049
72	500	0,01	0,093	0,304	0,187	0,013	0,049	0,055
72	500	0,05	0,463	0,347	0,222	0,014	0,054	0,057
72	500	0,1	0,927	0,369	0,238	0,008	0,055	0,068
72	500	0,25	2,317	0,403	0,249	0,003	0,067	0,088
72	499,5	0,5	4,634	0,411	0,264	0,005	0,071	0,071
72	499,25	0,75	6,952	0,443	0,270	0,017	0,073	0,083
72	499	1,0	9,27	0,489	0,300	0,024	0,060	0,105
72	498	2,0	18,54	0,511	0,307	0,038	0,049	0,117
72	495	5,0	46,35	0,194	0,107	0,048	0,011	0,028

Tabelle XVI.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	$Fe(OH)_3$-Hydrosol ccm	Fe-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,112	0,050	0,035	0,009	0,018
72	500	—	—	0,240	0,150	0,014	0,039	0,037
72	500	0,1	0,927	0,284	0,180	0,006	0,051	0,047
72	499,5	0,5	1,634	0,360	0,221	0,009	0,067	0,063
72	499	1,0	9,270	0,372	0,241	0,017	0,041	0,073
72	498	2,0	18,54	0,420	0,257	0,027	0,045	0,091
72	495	5,0	46,35	0,190	0,101	0,041	0,010	0,038
72	492,5	7,5	69.524	0,167	0,084	0,039	0,008	0,036
72	490	10,0	92,7	0,100	0,040	0,037	0,007	0,016
72	475	25,0	231,7	0,099	0,034	0,035	0,005	0,025

Tabelle XVIa.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	$Fe(OH)_3$-Hydrosol ccm	Fe-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,164	0,078	0,042	0,011	0,033
72	500	—	—	0,319	0,187	0,019	0,049	0,064
72	500	0,05	0,463	0,339	0,202	0,012	0,058	0,067
72	500	0,1	0,927	0,387	0,240	0,010	0,061	0,076
72	500	0,25	2,317	0,389	0,243	0,005	0,074	0,067
72	499,5	0,50	4,635	0,409	0,253	0,017	0,075	0,064
72	499,25	0,75	6,952	0,429	0,257	0,022	0,074	0,076
72	499	1,0	9,27	0,464	0,267	0,027	0,056	0,114
72	498,5	1,5	13,905	0,500	0,300	0,034	0,047	0,119
72	498	2,0	18,54	0,537	0,324	0,040	0,045	0,128
72	495	5,0	46,35	0,192	0,102	0,043	0,013	0,034

Wenn man diese Resultate mit denjenigen vergleicht, welche man mit dem auf chemischem Wege hergestellten Hydrosol, d. h.

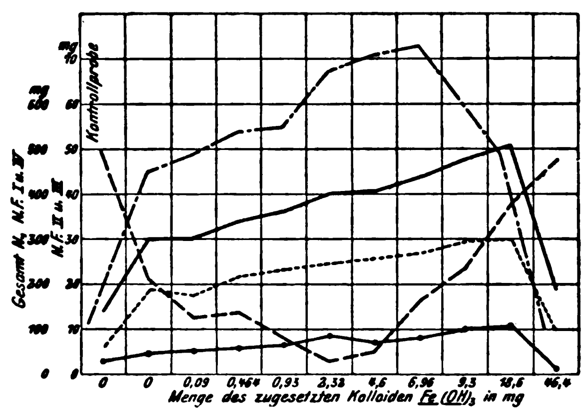
$Fe(OH)_3$

hergestellt nach Kreke (13); Gehalt an Metall 0,927°/₀,

Acidität in HCl ausgedrückt = 0,2004°/₀

erhält, und welche in folgenden Tabellen und Kurve wiedergegeben sind,

sieht man, daß im großen und ganzen die Wirkung des Fe-Hydrosols derjenigen des kolloidalen $Fe(OH)_3$ von **Kreke** fast gleich ist, obwohl zwischen ihnen einige Unterschiede quantitativer Natur bestehen.



Kurve 8.

Während in der Tat das Optimum der Gesamtautolyse mit ca. 0,018 g $Fe(OH)_3$ erzielt wird und 0,046 g schon eine hemmende Dosis darstellen, sind ca. 0,032 g des Fe-Hydrosols notwendig, um das Optimum, und mehr als 0,10 g, um eine Abnahme der Gesamtautolyse zu erzielen.

Das Gegenteil beobachtet man in bezug auf die Purinbasen; während 0,0025 g des Fe-Hydrosols das Optimum und 0,009 g die kleinste hemmende Dosis darstellen, sind 0,007 g des kolloidalen $Fe(OH)_3$ von **Kreke** erforderlich, um das Optimum, und mehr als 0,013 g, um eine Abnahme des Purin-N zu erzielen.

Dagegen ist das Verhalten der beiden Körper fast gleich in bezug auf die Albumose. Wir berichten die Tatsache ohne uns vorläufig in Erklärungsversuche einzulassen.

Quecksilber,
hergestellt mit der Bredigschen Methode nach den Angaben von Stodel (14). Gehalt an Metall 0,014%; K = 0,076.

Tabelle XVII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Hg-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Hg-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoamino-säuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diamino-säuren, Pep-tone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,183	0,081	0,041	0,009	0,052
72	500	—	—	0,289	0,168	0,021	0,048	0,052
72	499,5	0.5	0,07	0,292	0,184	0,021	0,047	0,040
72	497,5	2,5	0,35	0,302	0,216	0,021	0,053	0,012
72	495	5,0	0,7	0,328	0,228	0,021	0,062	0,017
72	475	25	3,5	0,365	0,243	0,021	0,071	0,030
72	450	50	7	0,388	0,268	0,025	0,036	0,059
72	400	100	14	0,402	0,282	0,031	0,027	0,062
72	300	200	28	0,269	0,150	0,035	0,017	0,067
72	—	500	70	0,190	0,099	0,040	0,011	0,040
72	475	Ag-25	—	0,439	0,301	0,024	0,076	0,038

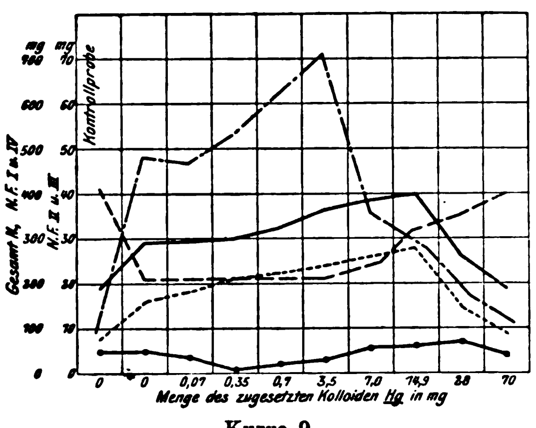
Tabelle XVIII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Hg-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Hg-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoamino-säuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diamino-säuren, Pep-tone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,168	0,074	0,037	0,013	0,044
72	500	—	—	0,286	0,150	0,017	0,036	0,083
72	495	5	0,7	0,329	0,244	0,019	0,050	0,016
72	475	25	3,5	0,364	0,260	0,017	0,064	0,023
72	450	50	7	0,372	0,286	0.022	0,027	0,037
72	400	100	14	0,434	0,325	0,029	0,019	0,061
72	400	100*	14	0,398	0,289	0,031	0,024	0,054
72	—	500	70	0,176	0,090	0,035	0,010	0,041
72	—	500*	70	0,165	0,077	0,034	0,009	0,045

* nicht stabilisiert.

Das Hydrosol des Hg ist grauschwarz, sehr instabil. Bezüglich der Wirkung dieses Hydrosols auf die Leberautolyse kann ich die von Randacio (15) unter Leitung von Cesare Biondi

erhaltenen Resultate völlig bestätigen. Es besitzt jedoch keine sehr energische Wirkung; das Optimum erzielt man mit zirka 0,015 g Metall. In kleinen Dosen übt es absolut keinen Einfluß auf die Albumosen aus; nur hohe Dosen bewirken eine Zunahme. Dagegen wirkt es in hervorragender Weise auf die Spaltung der Nucleine; kleinste Dosen (0,000 35 g Hg) beeinflussen schon in günstiger und deutlicher Weise diese letztere, während sie fast wirkungslos für die Gesamtautolyse sind; das Optimum erreicht man mit ca. 0,0035 g; dagegen üben 0,009 g schon eine deutlich hemmende Wirkung aus. Es besteht also eine gewisse Analogie zwischen dem Quecksilber- und dem Iridium-Hydrosol, obwohl sich jenes von diesem durch die geringere Wirksamkeit nur dadurch unterscheidet, daß schon ziemlich kleine Dosen eine deutlich hemmende Wirkung entfalten.



Kurve 9.

Zu ähnlichen Resultaten sind andere Autoren gelangt, welche den Einfluß der Hg-Salze auf verschiedene biologische Prozesse untersucht haben. So beobachtete Schultz (16), daß nach Zusatz von minimalen $HgCl_2$ Mengen die Alkoholgärung intensiver wurde; Bredig (17) fand, daß Spuren dieses Salzes die Zersetzung des H_2O_2 durch das Au-Hydrosol beschleunigen, während größere Mengen (1 g Mol auf 1000000 l) dieselbe hemmen, und diese Tatsache wurde dann in einer eingehenderen Arbeit von V. Henri und Stodel (18) bestätigt. Trillat (19) hat beobachtet, daß das $HgCl_2$ eine ähnliche doppelte Wirkung auf das oxydierende Vermögen der Mangansalze besitzt. Stassano (20) hat durch eine Reihe von Versuchen nachgewiesen, daß das $HgCl_2$ eine gleiche Wirkung auf die Lakkase und die Tyrosinase, auf die spontane Oxydation der Pyrogallussäure, auf das Reduktionsvermögen der Polyphenole, auf die Ent-

färbung des Indigos durch H_2O_2, auf die Reaktion der Leukobase des Methylenblaus, auf die Gerinnung des Blutes und auf das proteolytische Vermögen des Trypsins ausübt. Marck (21), welcher mit kolloidalem Manganoxyd Versuche ausführte, bestätigte die Resultate von Bredig, und Weinmayr (22) konnte nachweisen, daß diese Spaltung auch durch Hg allein bewirkt wird.

Mangandioxyd,

MnO_2, hergestellt nach Marck (21). Gehalt an Metall 0,0299 %; K = 0,0099.

Tabelle XIX.

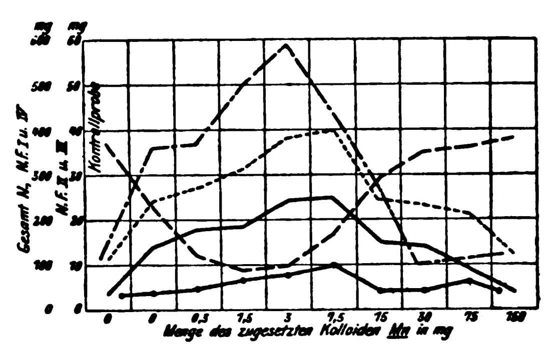
Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	MnO_2-Hydrosol (stab.) ccm	Mn-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,134	0,049	0,040	0,009	0,036
72	500	—	—	0,295	0,182	0,024	0,042	0,047
72	495	5	1,495	0,377	0,242	0,019	0,041	0,075
72	490	10	2,99	0,408	0,260	0,009	0.052	0,087
72	475	25	7,475	0,439	0,274	0,006	0,061	0,098
72	450	50	14,95	0,325	0,194	0.021	0,034	0.076
72	425	75	22,425	0,317	0,178	0,028	0,027	0,084
72	400	100	29,9	0,289	0,154	0,035	0.015	0,085
72	250	250	74,75	0,267	0,141	0.039	0,008	0,079
72	—	500	149,5	0,160	0,064	0,022	0,009	0,055

Tabelle XX.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	MnO_2-Hydrosol (stab.) ccm	Mn-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,117	0,038	0,037	0,011	0,031
72	500	—	—	0,239	0,145	0,023	0,036	0,035
72	499	1	0,299	0,274	0,178	0,012	0,037	0,047
72	495	5	1,495	0,309	0,182	0,009	0,049	0,069
72	490	10	2,99	0,384	0,240	0,010	0,059	0,075
72	475	25	7,475	0,397	0,241	0,017	0,040	0,099
72	475	25*	7,475	0,391	0,243	0,019	0,032	0,097
72	450	50	14,95	0,245	0,154	0,029	0,022	0,040
72	400	100	29,9	0,236	0,140	0,035	0,010	0,041
72	250	250	74,75	0,205	0,094	0,036	0,011	0,064
72	—	500	149,5	0,123	0,044	0,038	0,012	0,045

*) nicht stabilisiert.

Dieses Kolloid besitzt eine sehr ausgesprochene Wirkung; schon äußerst kleine Dosen (0,0003 g) befördern bedeutend die Gesamtautolyse; dagegen beeinflussen diese kleinen Dosen, zum Unterschiede von allen anderen Kolloiden, keineswegs die Spaltung der Nucleine. Statt dessen vermindern kleine Dosen beträchtlich die Gesamtmengen der Albumosen.



Kurve 10.

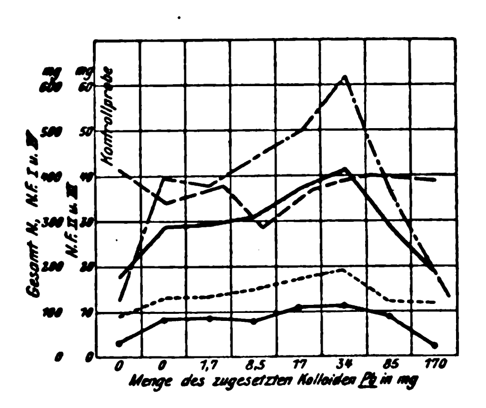
Auch hier folgt der höchsten beschleunigenden Wirkung — welche mit für alle Fraktionen und für die Gesamtautolyse mehr oder minder gleichen Dosen erzielt wird — eine hemmende Wirkung.

Bezüglich des Wirkungsmechanismus nähert sich dieses auf chemischem Wege hergestellte Kolloid dem Iridium-Hydrosol, obwohl es sich von diesem durch die geringere Wirkung auf die Spaltung der Nucleine und durch seine hervorragende Wirkung auf die Albumosen unterscheidet.

Blei,

hergestellt nach Bredig. Gehalt an Metall 0,034 %.

Es hat grauschwarze Farbe, ist sehr instabil, kann auch mit Strömen von geringer Spannung leicht hergestellt werden.



Kurve 11.

Tabelle XXI.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Pb-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Pb-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,121	0,047	0,044	0,006	0,024
72	500	—	—	0,309	0,231	0,034	0,033	0,011
72	495	5	1,7	0,320	0,241	0,034	0,035	0,010
72	490	10	3,4	0,340	0,251	0,035	0,036	0,018
72	475	25	8,5	0,368	0,270	0,024	0,039	0,035
72	450	50	17	0,397	0,274	0,036	0,041	0,046
72	400	100	34	0,459	0,322	0,038	0,058	0,041
72	300	200	68	0,326	0,233	0,038	0,034	0,021
72	—	500	170	0,143	0,082	0,040	0,014	0,007

Tabelle XXII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Pb-Hydrosol (stabilisiert) ccm	Pb-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,174	0,091	0,041	0,012	0,030
72	500	—	—	0,286	0,134	0,034	0,039	0,079
72	495	5	1,7	0,294	0,135	0,038	0,038	0,083
72	475	25	8,5	0,302	0,148	0,029	0,044	0,081
72	450	50	17	0,370	0,174	0,037	0,050	0,109
72	400	100	34	0,408	0,196	0,039	0,062	0,111
72	400	100*	34	0,399	0,188	0,036	0,054	0,121
72	250	250	85	0,296	0,129	0,040	0,037	0,090
72	—	500	170	0.194	0,120	0,039	0,013	0,022
72	—	500*	170	0,192	0,116	0,040	0,011	0,025

* nicht stabilisiert.

Dieses Kolloid besitzt keine sehr energische Wirkung weder auf die Gesamtautolyse noch auf die einzelnen Fraktionen. Die erstere wird erst durch verhältnismäßig große Metallmengen (0,008 g) beeinflußt; und während die übrigen Fraktionen sich wie der Gesamt-N verhalten, scheint sich die Albumose von ihnen dadurch zu unterscheiden, daß viel geringere Dosen (0,003 g) des Kolloids eine beträchtliche Abnahme ihrer Menge bewirken.

Auch in diesem Falle folgt der befördernden eine hemmende Wirkung, und zwar bei gleichen Dosen für alle Fraktionen, mit Ausnahme der Albumosen, deren Menge schon bei minimalen Dosen des Kolloids zunimmt, welche die Gesamtautolyse günstig beeinflussen. Diese Resultate stimmen mit denjenigen überein, welche Preti (23) in diesem Institute bei seinen Versuchen über die Wirkung der Pb-Salze auf die Leberautolyse erhalten hat. Die kleinen Dosen der Pb-Salze (Acetat, Nitrat) befördern die Gesamtautolyse, die mittleren bringen sie zur höchsten Intensität und die großen hemmen sie. Wenn man jedoch die Mengen des Metalls, welche in den zwei verschiedenen physikalischen Zuständen (Hydrosol und Salzlösung) eine ähnliche Wirkung ausüben, miteinander vergleicht, so sieht man, daß während annähernd gleiche Metallmengen (0,05 g Pb) in gleicher Weise die Leberautolyse befördern und zum Maximum erhöhen, dagegen viel größere Mengen Pb in Form seiner Salze notwendig sind, um eine hemmende Wirkung zu erzielen.

Aluminiumhydroxyd.

$Al_6O_{14}H_{10}$,[1]) hergestellt nach Schlumberger (23). Metallgehalt 0,7 %; Acidität in HCl ausgedrückt = 1,04 %.

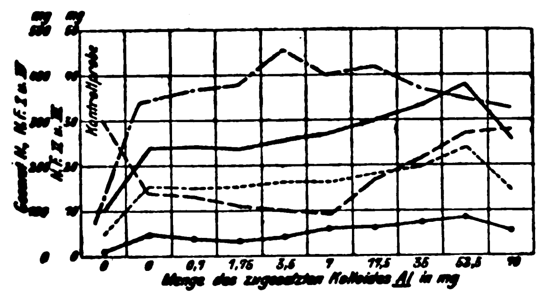
Tabelle XXIII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	$Al_6O_{14}H_{10}$-Hydrosol (nicht stab.) ccm	Al-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,112	0,059	0,034	0,008	0,011
72	500	—	—	0,289	0,178	0,021	0,039	0,051
72	499,5	0,5	3,5	0,304	0,184	0,014	0,045	0,061
72	499	1,0	7,0	0,330	0,197	0,011	0,044	0.078
72	497,5	2,5	17,5	0,358	0,219	0,019	0,043	0,077
72	495	5,0	35,0	0,390	0,247	0,023	0,038	0,082
72	492,5	7,5	52,5	0,412	0,253	0,026	0,037	0,096
72	490	10	70	0,340	0,182	0,035	0,036	0,087
72	485	15	105	0,299	0,169	0,033	0,028	0,069
72	480	20	140	0,287	0,159	0,035	0,019	0,074
72	450	50	350	0,214	0,121	0,031	0,009	0,053
72	400	100	700	0,115	0,051	0,030	0,009	0,025

Tabelle XXIV.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	$Al_6O_{14}H_{10}$-Hydrosol (nicht stab.) ccm	Al-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,107	0,057	0,030	0,007	0,013
72	500	—	—	0,244	0,158	0,014	0,034	0,046
72	500	0,1	0,7	0,240	0,150	0,013	0,037	0,040
72	500	0,25	1,75	0,239	0,154	0,011	0,038	0,036
72	499,5	0,5	3,5	0,257	0,160	0,010	0,045	0,042
72	499	1,0	7,0	0,270	0,161	0,009	0,040	0,060
72	497,5	2,5	17,5	0,301	0,183	0,017	0,042	0,059
72	495	5,0	35,0	0,330	0,199	0,021	0,037	0,073
72	492,5	7,5	52,5	0,389	0,240	0,027	0,035	0,087
72	490	10,0	70	0,267	0,149	0,028	0,033	0,057

[1]) Die Acidität des zugesetzten Kolloids beeinflußt nicht in bemerkenswerter Weise die Leberautolyse, wie aus den bereits in der 2. Mitteilung berichteten Kontrollversuchen hervorgeht.



Kurve 12.

Dieses Kolloid besitzt, wie aus den obigen Tabellen und Kurven hervorgeht, eine sehr schwache Wirkung; auch dieses Kolloid hat die Eigenschaft, in kleinen Dosen die Gesamtautolyse zu befördern und sie in sehr großen Dosen (0,350 g) zu hemmen. Die Spaltung der Nucleine wird sehr schwach beeinflußt; die Wirkung von kleinen Dosen dieses Kolloids auf die Albumosen ist zweifelhaft; nur große Dosen bewirken eine Zunahme ihrer Menge.

Arsentrisulfid,

hergestellt nach H. Schultze (25). Gehalt an As_2S_3: 1,288% = 0,7867% As.

Tabelle XXV.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	As_2S_3-Hydrosol (stabilisiert) ccm	As-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,124	0,063	0,040	0,010	0,011
72	500	—	—	0,268	0,174	0,019	0,044	0,031
72	500	0,05	0,393	0,269	0,170	0,019	0,048	0,032
72	500	0,1	0,786	0,289	0,188	0,011	0,055	0,035
72	499,5	0,5	3,93	0,327	0,199	0,007	0,064	0,057
72	499	1,0	7,86	0,384	0,238	0,015	0,072	0,059
72	498,5	1,5	11,79	0,431	0,260	0,021	0,070	0,080
72	497	3,0	23,58	0,349	0,199	0,028	0,061	0,061
72	495	5,0	39,3	0,312	0,174	0,035	0,049	0,054
72	490	10,0	78,6	0,280	0,170	0,040	0,012	0,058

Tabelle XXVI.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	As_2S_3-Hydrosol (stabilisiert) ccm	As-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,119	0,059	0,042	0,009	0,009
72	500	—	—	0,262	0,159	0,019	0,037	0,047
72	500	0,05	0,393	0,260	0,161	0,017	0,038	0,044
72	499,9	0,1	0,786	0,279	0,168	0,014	0,045	0,052
72	499,5	0,5	3,93	0,302	0,183	0,006	0,052	0,061
72	499	1,0	7,86	0,384	0,217	0,012	0,064	0,091
72	497,5	2,5	19,65	0,484	0,275	0,024	0,073	0,112
72	495	5,0	39,3	0,370	0,205	0,031	0,051	0,083
72	490	10,0	78,6	0,307	0,171	0,043	0,016	0,077
72	450	50,0	393	0,149	0,061	0,044	0,008	0,036

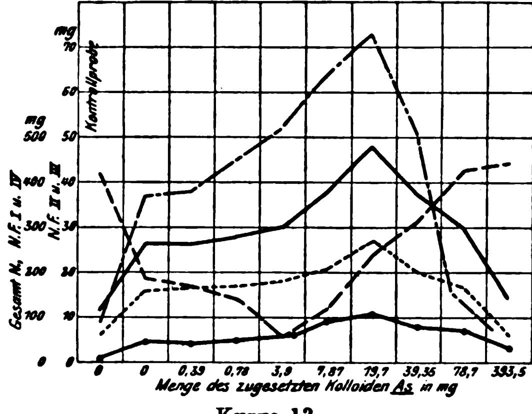
Tabelle XXVII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	As_2S_3-Hydrosol (stabilisiert) ccm	As-Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	0,127	0,068	0,041	0,008	0,010
72	500	—	—	0,284	0,178	0,011	0,040	0,055
72	500	0,25	1,965	0,319	0,203	0,007	0,044	0,061
72	498,5	1,5	11,79	0,437	0,256	0,019	0,067	0,095
72	498,5	1,5*	11,79	0,411	0,250	0,021	0,068	0,072
72	495	5	39,3	0,309	0,197	0,030	0,042	0,040
72	475	25	196,5	0,239	0,130	0,040	0,012	0,057
72	450	50	393	0,122	0,065	0,043	0,009	0,005
72	400	100	786	0,125	0,064	0,040	0,007	0,014
72	300	200	1572	0,119	0,059	0,039	0,007	0,014

* nicht stabilisiert.

Auch dieses, auf chemischem Wege hergestellte Kolloid, erinnert in seiner Wirkungsweise, ähnlich wie das Pb-Kolloid, an das Iridium-Hydrosol. Demselben nähert es sich besonders durch die kleinen As-Mengen, welche genügen, um das Optimum sowohl der Gesamtautolyse wie die der verschiedenen Fraktionen zu erreichen, obwohl es in bezug auf die Vermehrung des nicht koagulierbaren Stickstoffs weit unter dem Iridium-Hydrosol

steht. Die höchste befördernde Dosis, als As gerechnet, ist = ca. 0,020 g, die kleinste hemmende Dosis = ca. 0,080 g.



Kurve 13.

Über die Wirkung des As liegen schon die Arbeiten von Laqueur (26) und von Heß und Saxl (27) vor, welche den von der arsenigen Säure und von einigen As-Salzen auf die Leberautolyse ausgeübten Einfluß untersucht und dabei gefunden haben, daß As schon in verhältnismäßig kleinen Dosen eine hemmende Wirkung auf diesen Prozeß ausüben. Bei unseren Versuchsbedingungen hat jedoch auch das As die Fähigkeit gezeigt, in minimalen Dosen eine günstige Wirkung auf den autolytischen Prozeß auszuüben, was möglicherweise von dem verschiedenen Zustande (Kolloid und Salzlösung) abhängen kann.

Bei den berichteten Versuchen haben wir, wie bereits gesagt, in erster Linie danach gestrebt, zu erforschen, welche Wirkung die Ir-, Pb-, Cu-, Fe- und Hg-Hydrosole auf die Leberautolyse entfalten, und können diesbezüglich aus unseren Beobachtungen schließen, daß, ähnlich wie wir es bei den anderen Metall-Hydrosolen beobachtet hatten, auch diese Metalle im kolloidalen Zustande diesen biologischen Prozeß in verschiedenem Grade intensiver gestalten.

Zweitens hatten wir uns die Aufgabe gestellt, die Frage zu lösen, ob sich die Wirkung, welche die verschiedenen Hydrosole auf den autolytischen Prozeß ausüben, als dieselbe erweist, wenn man außer dem Gesamt-N auch die verschiedenen Endprodukte desselben untersucht, oder ob dagegen die einzelnen

Kolloide eine je nach der Natur des Metalls verschiedene Wirkung ausüben.

Hier sind wir aber auf mehrere Schwierigkeiten gestoßen; die erste derselben bestand in den großen Verschiedenheiten, welche die einzelnen Lebern in bezug auf den autolytischen Prozeß aufweisen und welche es nicht erlauben, die Resultate der verschiedenen Versuche miteinander in jeder Hinsicht zu vergleichen. Aus diesem Grunde müssen wir, bevor wir irgendwelche Schlußfolgerungen ziehen, gründlich untersuchen, bis zu welchem Grade uns diese Versuche zu einer vergleichenden Beurteilung verwertbare Resultate liefern können.

Was die einzelnen Versuche mit Zusatz von Kolloiden anbetrifft, so kann man, da die verschiedenen Versuche hinsichtlich der angewendeten Leber, der Dauer des Versuches, der Untersuchungs- und Titrierungsmethode unter vollständig gleichen Verhältnissen ausgeführt wurden, nicht nur die bei den einzelnen Versuchen mit Zusatz eines Kolloids festgestellten verschiedenen Mengen des Gesamtstickstoffs, sondern auch die verschiedenen Änderungen des Verhältnisses zwischen dem Gesamt-N und dem einzelnen Produkte der Autolyse, mit den Werten vergleichen, welche bei den Kontrollversuchen gefunden wurden.

Man kann auch innerhalb gewisser Grenzen einen Vergleich zwischen den verschiedenen mit demselben Kolloid, aber mit verschiedenen Lebern ausgeführten Versuchen anstellen, und ebenso zwischen den mit verschiedenen Kolloiden gemachten Proben. Wenn wir nämlich nicht direkt die Resultate der einzelnen Versuche miteinander vergleichen, sondern nur das Verhältnis der Resultate der einzelnen Versuche mit Zusatz von einem Kolloid zu dem Resultate des Kontrollversuches, so stellen sich ähnliche Zustände heraus wie im vorigen Falle, vorausgesetzt, daß man vorher die Frage löst, ob gleiche Kolloidmengen unter gleichen Versuchsbedingungen auf die verschiedenen Fraktionen eine verschiedene Wirkung ausüben können, je nach der Leber, welche angewendet wird.

Die Versuchsprotokolle, welche sich auf die Wirkung des $Fe(OH)_3$ und des As_2S_3 beziehen, verneinen diese Frage, und zu ähnlichen Schlüssen führen die zahlreichen Versuche, welche wir mit Ag und mit anderen Metallen im kolloidalen Zustande ausgeführt und in den früheren Arbeiten berichtet haben.

Aus allen diesen Versuchen geht hervor, daß **jedes Hydrosol hinsichtlich seiner Beeinflussung der verschiedenen Fraktionen einen konstanten Wirkungstypus aufweist.**

Wir haben jedoch die Berechtigung dieser Schlußfolgerungen auch aus einem anderen Gesichtspunkte kontrollieren wollen; und haben so Versuche angestellt, um die Wirkung der verschiedenen Kolloide auf einen und denselben Leberbrei festzustellen und die erhaltenen Resultate miteinander verglichen.

Der Kürze halber berichten wir nur über einen Teil dieser Versuche.

Tabelle XXVIII.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Name des zugesetzten Hydrosols	Zugesetztes Hydrosol ccm	Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	—	0,121	0,060	0,031	0,009	0,021
72	500	—	—	—	0,264	0,168	0,019	0,027	0,050
72	475	Ag	25	9,625	0,288	0,156	0,021	0,033	0,078
72	400	Ag	100	38,5	0,397	0,192	0,027	0,049	0,129
72	475	Au	25	7,25	0,272	0,164	0,012	0,030	0,066
72	400	Au	100	29,0	0,314	0,183	0,020	0,039	0,072
72	475	Pt	25	10,75	0,289	0,152	0,015	0,035	0,087
72	400	Pt	100	43,0	0,340	0,180	0,011	0,048	0,101
72	495	Ir	5	1,1	0,349	0,183	0,020	0,030	0,116
72	450	Ir	50	11,0	0,508	0,264	0,018	0,035	0,191

Tabelle XXIX.

Versuchsdauer in Stunden	Destilliertes H_2O ccm	Name des zugesetzten Hydrosols	Zugesetztes Hydrosol ccm	Gehalt mg	Gesamt-N g	Monoaminosäuren-N g	Albumosen-N g	Purinbasen-N g	Diaminosäuren, Peptone, NH_3-N g
—	500	—	—	—	0,162	0,080	0,041	0,012	0,029
72	500	—	—	—	0,245	0,160	0,021	0,030	0,034
72	495	Hg	5	0,7	0,281	0,189	0,021	0,049	0,022
72	450	Hg	10	7,0	0,340	0,253	0,028	0,021	0,038
72	500	$Fe(OH)_3$	0,05	0,463	0,281	0,174	0,014	0,053	0,040
72	499	$Fe(OH)_3$	1,0	9,27	0,370	0,200	0,025	0,057	0,088
72	500	As_2S_3	0,25	1,965	0,289	0,198	0,009	0,039	0,043
72	498,5	As_2S_3	1,5	11,79	0,400	0,222	0,029	0,058	0,091
72	475	Pb	25	8,5	0,267	0,139	0,020	0,034	0,074
72	400	Pb	100	34,0	0,380	0,198	0,029	0,045	0,108

Auf Grund dieser und zahlreicher anderer Experimente können wir behaupten, daß auch in diesem Falle die Verhältnisse unverändert bleiben, welche wir aus dem Vergleich der oben berichteten und auf verschiedene Lebern sich beziehenden Versuche hervorgehoben haben.[1])

Andere von uns ausgeführte Kontrollversuche beziehen sich auf die Wirkung von verschiedenen Präparaten eines und desselben Hydrosols; in den Tabellen habe ich nur diejenigen angeführt, welche ich mit Fe ausgeführt habe; diese und andere zahlreiche, der Kürze halber ausgelassene, führen uns zu der Schlußfolgerung, daß, wenn auch die verschiedenen Präparate nicht alle mit gleicher Intensität auf den autolytischen Prozeß wirken, dieselben doch in bezug auf die verschiedenen Fraktionen einen gleichen Wirkungstypus aufweisen, wobei das Verhältnis zwischen dem Gesamt-N und dem N der Endprodukte unverändert bleibt.

Wenn man die Versuchsprotokolle nach den angegebenen Kriterien betrachtet, so geht aus denselben hervor, daß zwischen den verschiedenen Hydrosolen bezüglich ihrer Wirkung auf die Autolyse bedeutende Unterschiede nachweisbar sind. Während in der Tat minimale Mengen von Ir, MnO_2, Hg, Fe, $Fe(OH)_3$, Cu, As_2S_3, Ag im kolloidalen Zustande genügen, um den autolytischen Prozeß in ziemlich hohem Grade zu beeinflussen, sind bedeutend größere Mengen von Pb, Al, Au, Pt, Pd notwendig, um eine auch nur

[1]) Wir müssen jedoch bemerken, daß diese Betrachtungen nur dann einen Wert haben, wenn man, wie wir bereits angegeben haben, die Resultate vergleicht, welche man durch Zusatz von solchen Kolloidmengen erhält, welche einen ausgesprochenen Einfluß ausüben; die niedrigeren Dosen können nicht in Betracht gezogen werden. Als Maß für unsere Vergleiche betrachten wir als minimale günstig wirkende Dosis diejenige Substanzmenge, welche eine Zunahme von wenigstens 0,020 g des nicht gerinnbaren Stickstoffs bewirkt, als maximale günstig wirkende Dosis diejenige Elementmenge, welche die höchste Zunahme bewirkt, und als minimale hemmende Dosis diejenige, welche einer N-Menge entspricht, welche weniger als die bei den Kontrollversuchen gefundene N-Menge beträgt. Diese letztere Zahl haben wir, um nicht unser Versuchsfeld übermäßig ausdehnen zu müssen, nur mit einer gewissen Annäherung bestimmt; der Fehler kann jedoch nicht mehr als 50 mg betragen.

geringe Zunahme des nicht koagulierbaren Stickstoffes zu bewirken.

Während z. B. 0,0002 g Cu genügen, um den Gesamt-N um 10 % zu vermehren und 0,0011 g Ir, um denselben um 33 % zu vermehren, sind 0,0066 g Pd notwendig, um die erstere und mehr als 0,133 g, um die zweite Vermehrung zu erzielen.

Unterschiede zwischen den einzelnen Elementen, und zwar in gleichem Sinne wie die hervorgehobenen, treten auch zutage, wenn anstatt des Einflusses auf die Gesamtautolyse jener auf die verschiedenen Endprodukte derselben analysiert wird.

Ein solches Verhalten legt die Frage nahe, ob diese Erscheinung mit anderen diesen Elementen eigentümlichen Eigenschaften in Zusammenhang steht und Analogien bietet. Die nähere Erörterung dieser Beziehungen wird passender bei Gelegenheit der Mitteilung und des Vergleiches der Wirkung der entsprechenden Salze erfolgen, auf die wir verweisen; an dieser Stelle mögen nur einige einleitende Bemerkungen Platz finden.

Im großen und ganzen ersehen wir aus den Versuchen, daß die Elemente mit niedrigem Atomgewichte stark wirksam, diejenigen mit höherem Atomgewicht weniger wirksam sich erweisen. Es kommen zwar nicht unerhebliche Abweichungen von dieser Regel vor (Ag, Hg, Ir einerseits, Al andrerseits). Wir müssen aber berücksichtigen, daß die Faktoren, die bei der Analyse im Spiele sind und störend eingreifen können, sehr zahlreich und komplizierter Natur sind, so daß eine genaue Übereinstimmung von vornherein auch dann nicht zu erwarten wäre, wenn der angedeutete Zusammenhang tatsächlich zu Recht bestünde. Von den vielen Möglichkeiten sei beispielsweise allein auf die event. teilweise Umwandlung der verschiedenen Kolloide in salzartige Verbindungen, auf die verschiedene Löslichkeit, den Dissoziationsgrad derselben hingewiesen. —

Zwischen den verschiedenen Kolloiden scheint der weitere Unterschied zu bestehen, daß ein Teil derselben nur eine befördernde Wirkung, und die übrigen zuerst eine befördernde und später, wenn die zugesetzte Hydrosolmenge eine gewisse Grenze überschreitet, eine hemmende Wirkung entfaltet. Ein Vergleich in dieser Richtung ist jedoch bei der Unmöglichkeit, für alle Elemente ein Hydrosol mit hohem Metallgehalt herzustellen, nicht möglich. Außerdem könnte es auch sein, daß,

ähnlich wie es für die minimale förderliche Dosis der Fall ist, auch in bezug auf die minimale hemmende Dosis bedeutende Unterschiede zwischen den verschiedenen Hydrosolen bestehen; d. h. daß bei den einen eine ziemlich kleine Menge genügt, während von anderen viel größere, und zwar größere als die von uns angewendeten Mengen notwendig sind, wie übrigens schon aus einem Vergleich zwischen der Wirkung des MnO_2 (welches schon in der Dosis von 0,03 g einen hemmenden Einfluß ausübt) und derjenigen des Pb (von welchem dagegen 0,17 g erforderlich sind, um eine hemmende Wirkung zu erzielen) und noch besser aus einem Vergleiche zwischen den beiden Hydrosolen des Fe hervorgeht, von denen das eine, welches einen geringen Metallgehalt besitzt, nur eine befördernde Wirkung entfaltet (siehe Tabelle XIII), während das zweite, welches einen viel höheren Metallgehalt hat, zuerst eine befördernde und dann eine hemmende Wirkung ausübt.

Auch auf die verschiedenen Endprodukte der Autolyse üben die Kolloide gänzlich verschiedene Wirkungen aus. Um nicht die Einzelheiten zu wiederholen, welche wir in bezug auf die verschiedenen Hydrosole berichtet haben, können wir die diesbezüglichen Ähnlichkeiten und Unterschiede folgendermaßen kurz zusammenfassen:

1. Die Bildung der Monoaminosäuren wird von allen Hydrosolen in mehr oder weniger gleicher Weise beeinflußt wie die Gesamtautolyse. Die Kurve entspricht hier für alle Hydrosole derjenigen des Gesamt-N.

2. Die Spaltung der Nucleine wird durch viel niedrigere Hydrosol-Dosen befördert als diejenigen, welche eine merkbare Steigerung der Gesamtautolyse hervorrufen. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden das kolloidale MnO_2 und $Fe(OH)_3$ und das Pb, welche eine Zunahme der Purinbasen erst in solchen Dosen bewirken, welche die Gesamtautolyse beeinflussen und das Hydrosol des $Al_6O_{14}H_{10}$, welches überhaupt keine befördernde Wirkung ausübt.

Der befördernden Wirkung folgt bei hohen Dosen eine hemmende Wirkung (mit Ausnahme der Ag-, Pt- und Au-Hydrosole in den von uns angewendeten Dosen); die Menge, welche notwendig ist, um diese Hemmung zu erzielen, ist für die einzelnen Hydrosole verschieden; sie ist jedoch immer gleich oder niedriger als diejenige, welche

einen hemmenden Einfluß auf die Gesamtautolye ausübt, nie höher.

3. Auch die Prozesse, mit welchen die nach der Autolyse vorgefundenen Albumosemengen in Beziehung stehen, werden von der Anwesenheit der metallischen Hydrosole in sehr verschiedener Weise beeinflußt, indem einige Hydrosole auch in minimaler Dosis eine Vermehrung, andere zuerst in kleinen Dosen eine Abnahme und dann eine Vermehrung der Gesamtmenge der Albumose bewirken.

Literatur.

1. Baumann u. Bömer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 219.
2. Rebière, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1908.
3. M. Ascoli u. G. Izar, diese Zeitschr. 14, 491.
4. Dieselben, diese Zeitschr. 10, 356.
5. G. Ascoli, Pflügers Archiv 72.
6. Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 45, 46, 50.
7. Burian, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43.
8. W. Jones, Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 42, 44, 48.
9. Wiener, Arch. f. experm. Pathol. u. Pharmakol. 40, 42.
10. Drjewezki, diese Zeitschr. 1, 223.
11. Preti, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 485.
12. Embden u. Knoop, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 123.
13. Kreke siehe Lottermoser, Über anorganische Kolloide, Stuttgart 1901.
14. Stodel, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1907.
15. Randaccio, Il Policlinico 1908.
16. Schultze, Pflügers Archiv 1888.
17. Bredig, Zeitschr. f. physikal. Chem. 1901. Anorganische Fermente, Leipzig 1901. Compt. rend. de l'Acc, de Soc. 1901.
18. V. Henri u. Stodel, zit. bei Stassano l. c.
19. Trillet, zit. bei Stassano l. c.
20. Stassano, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 58, 891 bis 893, 1905.
21. Marck, Inauguraldissertation, Heidelberg 1907.
22. Weinmayr, Inauguraldissertation, Heidelberg 1903.
23. Preti, Compt. rend. de la Soc. de Biol. 65, 227, 1908.
24. Schlumberger, Bull. soc. chim. de Paris 1895, No. 13.
25. Schultze s. Lottermoser l. c.
26. Laqueur, Schriften der Physik.-ökonom. Gesell. zu Königsberg.
27. Heß u. Saxl, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 5, 89.

Über Citronensäuregärung durch Citromyceten.

Von

Eduard Buchner und Hermann Wüstenfeld.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirtschaftl. Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 1. April 1909.)

Das Auftreten von Citronensäure als Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen steht bis jetzt in der Mykologie ziemlich vereinzelt da. Es beschränkt sich auf eine den Penicilliumarten nahe verwandte, morphologisch aber durch die Form der Conidienträger unterschiedene Schimmelpilzgattung: Citromyces, welche von Karl Wehmer[1]) aufgefunden und in zwei Hauptrepräsentanten: Citromyces Pfefferianus und C. glaber näher beschrieben wurde. Auf Grund dieser Entdeckung ist die Bildung von Citronensäure aus Zucker durch Citromyceten, welche im Anschluß an Wehmer[2]) im folgenden als Citronensäuregärung bezeichnet werden soll, von den „Fabriques de Produits Chimiques" zu Thann und Mühlhausen im Elsaß zur fabrikmäßigen Darstellung jener Säure verwendet worden.

Aus neuerer Zeit liegen Untersuchungen über den Vorgang von P. Mazé und A. Perrier[3]) vor, unter Benutzung von vier verschiedenen Citromycetenvarietäten, welche sich auf entsprechenden Säurelösungen von selbst eingestellt hatten und

---

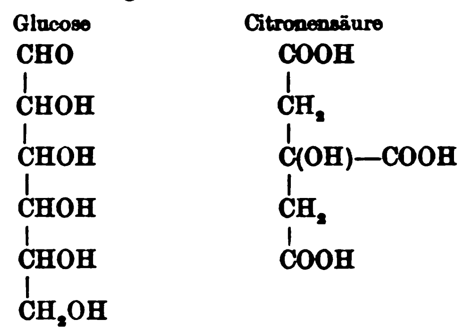
[1]) Beiträge z. Kenntnis einheim. Pilze, Heft 1, Hannover u. Leipzig 1893, 1 bis 92. — Sitzungsber. d. Kgl. Preuß. Akad. d. Wiss. 29, 519, 1893. — Bull. de la Soc. Chim. (3) 9, 728, 1893. — Compt. rend. 117, 332, 1893. — Vgl. ferner Lafar, Handb. d. techn. Mykologie 4, 246, 1906.

[2]) Beiträge z. Kenntnis einheim. Pilze 1893, 38.

[3]) Compt. rend. 139, 311, 1904. — Annales de l'Inst. Pasteur 18, 553, 1904.

und C. lacticus bezeichnet wurden. Die französischen Forscher konnten im allgemeinen die Angaben von Wehmer bestätigen und in mancher Richtung erweitern.

Der Vorgang der Citronensäurebildung aus Traubenzucker hat für den Chemiker großes theoretisches Interesse, weil jene Säure wegen ihrer verzweigten Kohlenstoffkette



nicht in einfacher Weise durch Oxydation aus Zucker entstehen kann; ihre Bildung muß vielmehr auf einem Ineinandergreifen von Spaltung und Synthese beruhen. Dieser Gesichtspunkt war es vor allem, der uns veranlaßte, jenen Gärungsvorgang abermals einer eingehenden Untersuchung zu unterziehen. Bei der Intensität der Säurebildung während gewisser Perioden der Pilzentwicklung schien es ferner nicht ausgeschlossen, daß die Bildung der Citronensäure auf eine vom lebenden Organismus vorläufig mit den Namen C. citricus, C. tartricus, C. oxalicus abtrennbare Enzymreaktion nachweislich zurückgeführt werden könnte, wenn schon die Kompliziertheit des chemischen Vorganges von vornherein nicht viel Hoffnung auf eine zellfreie Realisierung zuließ.

Auswahl des geeignetsten Pilzmateriales.

Die im Laboratorium vorhandene alte Kultur des C. Pfefferianus erwies sich als wenig wirksam. Bei einem orientierenden Versuch in Bierwürze entwickelten 1 g Mycel innerhalb 36 Tagen auch bei Gegenwart von Kreide nur 0,56 g Citronensäure. Erheblich bessere Resultate wurden mit den von Herrn Wehmer sowohl, wie von Herrn Mazé freundlichst zur Verfügung gestellten Originalstämmen erzielt, für deren Überlassung wir auch hier unseren besten Dank zum Ausdruck bringen.

Der C. Pfefferianus (Originalstamm) lieferte, obwohl mitgeteilt worden war, daß im Augenblick nur altes Trockenmaterial zur Verfügung stände, welches nur träge säuern werde, ebenfalls auf Bierwürze mit Calciumcarbonatzusatz innerhalb 5 Wochen auf 1 g Mycel 1,3 g Säure. Von den aus Paris gesandten 4 Varietäten zeigte sich ganz besonders der sogenannte C. citricus wirksam, von welchem auf Absud von weißen Bohnen mit Zucker und Kreidezusatz 1 g Mycel 3,9 g Citronensäure lieferten. Dieses ausgezeichnete Resultat ist übrigens zum Teil auf die angewandte sehr günstige Nährlösung, welche Mazé mit vollem Rechte empfiehlt, zurückzuführen. Ein direkter Vergleich zwischen C. Pfefferianus (alte Kultur) und C. citricus auf derselben Nährlösung, aus weißen Bohnen hergestellt, der allerdings bereits nach 14 Tagen unterbrochen wurde, zeigte keinen so großen Unterschied. Später fiel uns selbst ein Citromycet in die Hände, welcher sich im Vergleich mit C. citricus in Bierwürze als ebenso wirksam erwies. Dieser Pilz stammte von einer ganz verschimmelten Apfelsine, die in diesem Zustande direkt aus der Originalverpackung entnommen worden war. Der C. citricus, mit dem die meisten unserer Versuche ausgeführt sind, hat demnach keine ganz ungewöhnlichen Fähigkeiten.

Es zeigte sich ferner im Laufe unserer Untersuchungen, daß der C. Pfefferianus (alte Kultur) durch geeignete Umzüchtungen leicht zu stärkerer Citronensäurebildung angeregt werden kann. Ohne Einfluß blieb zwar, als dieser Pilz auf mit wenig freier Citronensäure versetzter stickstoffarmer Nährlösung aus grünen Bohnen mit Zusatz von 10°/₀ Zucker einige Male umgezüchtet worden war. Ebenso setzte mehrmaliges Kultivieren in stark citronensäurehaltiger Bierwürze nur die Wachstumsfähigkeit der Organismen auf neutralen Lösungen sehr herunter. Dagegen führte schon einmaliges Umzüchten auf stickstoffarmer und zuckerfreier Nährlösung aus grünen Bohnen, der aber jetzt bis zu 20°/₀ Citronensäure zugesetzt worden waren, zu gutem Erfolg. Nun wurde innerhalb 7 Wochen in verdünnter Bierwürze bei Kreidegegenwart fast die doppelte Menge des Mycels an Citronensäure gebildet.

Diese Variabilität des Gärvermögens ist auch schon von Wehmer[1]) hervorgehoben worden und erinnert an die merk-

[1]) Siehe Lafar, Handb. d. Mykologie 4, 248, 1906.

würdigen Beobachtungen von J. Katz[1]) über die regulatorische Bildung von Diastase bei Penicillium, Aspergillus usw.

Die günstigsten Nährlösungen.

Um entscheiden zu können, welche Nährlösungen zur Heranzüchtung stark wirksamen Mycels vorteilhaft seien, wurde eine größere Anzahl orientierender Versuche ausgeführt. Zunächst verglich man bei annähernd gleichem Zuckergehalt den Wert des von Mazé empfohlenen Absudes von weißen Bohnen (0,02 % N) mit etwa auf das Doppelte verdünnter Bierwürze (0,08 % Stickstoff) und einer abgesehen vom Zuckerzusatz anorganischen Nährsalzlösung nach Wehmer[2]) (0,35 % N als NH_4NO_3). Bei Zugabe von Kreide zeigte sich, daß die Menge des entstandenen Mycels mit dem Stickstoffgehalt ansteigt, daß aber die Menge der Citronensäure, welche durch 1 g Mycel gebildet worden war, umgekehrt in der stickstoffarmen Bohnennährlösung ein Maximum (2,5 g) erreichte. Die geringe Eignung der anorganischen Nährlösung wurde durch weitere Vergleiche mit dem Bohnenabsud festgestellt. Wenn die Pilze auch imstande sind, in einer solchen Nährsalzlösung mit Zucker als einziger Kohlenstoffquelle Säure zu bilden, so lassen die Ausbeuten doch sehr zu wünschen übrig. Der Grund dürfte in der Minderwertigkeit des Ammoniumnitrats im Vergleich zu organisch gebundenem Stickstoff zu suchen sein. Für Hefe hat H. Pringsheim[3]) nachgewiesen, daß die Kombination verschiedener organischer Stickstoffquellen die Entwicklung günstig beeinflußt, und daß die Eignung einer Stickstoffnahrung mit der Länge ihrer Kohlenstoffkette anwächst. Für Eumyceten, speziell Aspergillus niger, zeigte ferner F. Czapek[4]), daß nächst den Eiweißstoffen die Aminosäuren den höchsten Stickstoffnährwert besitzen. Dazu kommt noch, daß in Kulturen mit Ammoniumnitrat schon

---

[1]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 31, 599. 1898.

[2]) Botan. Zeitg. 41, 272, 1891; genaue Angaben über die speziell bei Citronensäuregärungen benutzten Nährlösungen liegen von Wehmer nicht vor, sondern nur ein Hinweis auf die eben zitierte Untersuchung über Oxalsäurebildung durch Schimmelpilze (Beiträge z. Kenntnis einheim. Pilze, Heft 1, 73).

[3]) Diese Zeitschr. 3, 121, 1907.

[4]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 538, 1902; 2, 547; 3, 47.

nach einigen Tagen freie anorganische Säure in ziemlicher Menge auftritt, was selbst durch Kreidezusatz nicht vollkommen verhindert wird. Es handelt sich dabei höchstwahrscheinlich um freie Salpetersäure. Schon Wehmer[1]) erkannte Ammonchlorid und Ammonsulfat als ungeeignete Stickstoffquellen für die Oxalsäurebildung durch Pilze, weil infolge der Stickstoffassimilation freie Mineralsäuren entstehen und Butkewitsch[2]) berichtet, daß Aspergillus aus Ammoniumnitrat hauptsächlich Ammoniak aufnimmt, worauf die auftretende freie Salpetersäure die Oxalsäurebildung ungünstig beeinflußt. Ähnliches wurde von J. Nikitinsky[3]), von E. Kohn und F. Czapek[4]), welch letztere Autoren von vitaler Säurebildung im Nährsubstrat durch das „Wahlvermögen" des Pilzes sprechen, und von W. Benecke[5]) beobachtet.

Nach diesen Erfahrungen konnte eine anorganische Stickstoffquelle für unsere Hauptversuche nicht mehr in Frage kommen. Schließlich haben wir auch noch die Eignung von Bohnenabsud mit der von stark verdünnter Bierwürze bei gleichem niederen Stickstoffgehalt (0,02 °/₀ N) und annähernd derselben Zuckerkonzentration (10 °/₀) verglichen. Bei Gegenwart von Kreide erwies sich der Auszug aus weißen Bohnen als erheblich besser, indem hier nach $6^1/_2$ Wochen auf 1 g Mycel 1,9 g Säure gebildet waren, in der Bierwürze aber nur 1,2 g. Die letztere scheint infolge höheren Gehaltes an geeigneter Kohlenstoffnahrung das Wachstum des C. citricus besonders zu befördern, so daß die Pilzernten hier stets höher waren; vielleicht begünstigt auch der größere Salzgehalt des Bohnenabsuds speziell die Säurebildung.

Unsere Versuche wurden stets einfach bei Zimmertemperatur ausgeführt. Wenn nach Wehmer[6]) bei der Citronensäuregärung die Temperatur nicht in gleichem Maße ausschlaggebend ist, wie bei der Oxalsäuregärung, so scheinen uns doch die weniger guten Ergebnisse mancher Versuche während der

---

[1]) Botan. Zeitg. 41, 338, 1891.
[2]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 38, 211, 1902.
[3]) Jahrb. f. wissensch. Botanik 40, 1, 1904.
[4]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 305, 1906.
[5]) Botan. Zeitg. II. Abt. 65, 75, 1907.
[6]) Vgl. Lafar, Handb. d. Mykologie 4, 246.

Sommermonate auf die hohe Temperatur zurückzuführen zu sein. Wir halten es deshalb für empfehlenswerter, auch mit den Citromyceten im Thermostaten bei etwa 20° zu arbeiten.

Bedeutung des Kreidezusatzes.

Um den Einfluß von Calciumcarbonat auf die Citronensäuregärung zu erforschen, sind ein großer Teil unserer vorläufigen Versuche sowohl mit als ohne diesen Zusatz ausgeführt worden. Da das Neutralisierungsmittel als festes Pulver am Boden der Nährlösung liegt, tritt die Wirkung nur träge ein und wird durch sich ausscheidende Krusten von Calciumcitrat noch weiter verlangsamt. Der Zusatz von gelösten kohlensauren Salzen, wie z. B. von Alkalicarbonat, verbietet sich, da sie schon in Mengen von 1 bis 2°/₀ einen so stark schädigenden Einfluß ausüben, daß nicht einmal Auskeimung der Sporen stattfindet. Auch die Gegenwart von Kreide ist für die Entwicklung der Mycelien selbst nicht förderlich. Will man aber größere Mengen von Citronensäure aus Zucker erhalten, so blieb der Zusatz von Calciumcarbonat unentbehrlich. Ohne letzteres kann bereits gebildete Citronensäure im Laufe der Zeit wieder aus den Kulturen verschwinden. Direkte Versuche haben uns überzeugt, daß diese Säure von den Citromyceten als einzige Kohlenstoffnahrung gut assimiliert wird, und daß sie aus Bohnenabsud bei Abwesenheit von Zucker auf Aussaat von C. citricus wie von C. Pfefferianus allmählich verschwindet.

Die Citronensäure erscheint demnach keineswegs als unbrauchbares Nebenprodukt der Zuckerassimilation, sondern als Durchgangsstufe bei den Oxydationsvorgängen, welche sich unter geeigneten Umständen anhäufen, aber auch weiter verbrannt werden kann. Wehmer[1]) weist ebenfalls darauf hin, daß diese Substanz als ein intermediäres, nur für den Augenblick der weiteren Zerstörung entgangenes Produkt betrachtet werden muß. Durch Kreidezusatz wird sie wenigstens großenteils in unlöslichem Zustande dem Stoffwechsel vorläufig entzogen.

---

[1]) Lafar, Handb. d. Mykologie 4, 247, 1906.

Höchstausbeuten an Citronensäure aus Zucker.

Will man aus Zucker eine möglichst gute Ausbeute an Citronensäure erhalten, so muß deshalb Kreide zugesetzt werden. In mehreren Versuchen ist es uns gelungen, mehr als die Hälfte des Zuckergewichts in Form jenes Gärproduktes wieder zu erhalten; am günstigsten verlief eine Gärung, bei welcher durch C. citricus in stickstoffarmer 13%iger Traubenzuckerlösung innerhalb 8 Wochen die 8fache Menge des Mycelgewichtes an Zucker verbraucht und das 4,3fache Mycelgewicht in Form von Citronensäure gewonnen wurde, so daß die Ausbeute an letzterem Produkt 55% des Zuckergewichtes erreichte.

Diese unsere Höchstausbeuten stimmen überein mit den Angaben von Wehmer[1]), welcher als günstige Beispiele ebenfalls Ausbeuten von rund 50% des Zuckers an Citronensäure anführt; in einigen Fällen ist es jenem Autor allerdings gelungen, bis zu 70% Säure zu erhalten[2]). Auch Mazé und Perrier[3]), welche wie wir und im Gegensatz zu Wehmer, mit C. citricus arbeiteten, haben in einem ausführlich beschriebenen Versuch 45,2% des Traubenzuckers als Citronensäure wiedergewonnen. Mit günstig wirksamen Citromyceten scheint also ganz allgemein auf eine Ausbeute von ungefähr der Hälfte des Zuckergewichtes zu rechnen zu sein.

Einfluß der Verdünnung und der Schichthöhe der Nährlösung.

Die Angaben von Mazé über die Bedeutung des Stickstoffgehaltes der Nährlösung für die Intensität der Citronensäurebildung haben uns veranlaßt, ausführlich den Wert eines 0,06% Stickstoff enthaltenden Bohnenabsudes zu vergleichen, mit dem derselben, aber auf das 3fache verdünnten Kulturflüssigkeit, beide bei Zusatz von 10% Zucker. Gleichzeitig wurde der Einfluß der Schichthöhe der Nährlösung, welche für den Gaswechsel und den Sauerstoffbedarf der Mycelpilze von Wichtigkeit ist und bei Gegenwart von Calciumcarbonat sich in erleichterter oder erschwerter Neutralisationsmöglichkeit zur Geltung bringen mußte, untersucht.

---

[1]) Beiträge z. Kenntnis einheim. Pilze 1893, 55, 56.

[2]) Ebenda 79.

[3]) Annales de l'Inst. Pasteur 18, 561, 1904.

Es zeigte sich zunächst, daß bei Gegenwart von großen Zuckermengen und von verhältnismäßig wenig Stickstoffnahrung (0,06 °/₀ bzw. 0,02 °/₀ N) das Gewicht des gebildeten Mycels nur von der Gesamtmenge an Stickstoff in der Kulturflüssigkeit abhängt. Auch in der verdünnteren Lösung war demnach der Gehalt an Salzen noch ausreichend. Die Versuche ohne Calciumcarbonat ergaben natürlich verschiedene Unregelmäßigkeiten. Bei Kreidezusatz begünstigt eine geringe Schichthöhe, welche bei gleichem Volumen der Flüssigkeit zu der Größe der Oberfläche der Nährlösung, auf der sich die Mycelien ausschließlich ansiedeln, infolge der Kegelform der Gefäße (Erlenmeyer-Kolben) in umgekehrtem Verhältnis steht, die Mycelentwicklung und zugleich die Säurebildung. In den verdünnteren Lösungen war die Produktion an Citronensäure bei weitem größer; sie erreichte auf 1 g Mycel wieder 1,9 g und bei gleichzeitig kleiner Schichthöhe sogar 2,16 g Säure.

Die besten Ergebnisse, was Säurebildung betrifft, sind somit unter Kreidezusatz in niederen Flüssigkeitsschichten, also in flachen Schalen, und bei sehr geringer Stickstoffnahrung zu erzielen. Dünne Myceldecken geben bei gleichem Gewicht relativ viel mehr Citronensäure wie dicke. Der Grund dieser Tatsache liegt wohl einerseits in einem bedeutenden Einfluß des Luftsauerstoffes, der bei schwächeren Pilzrasen reichlicher mit den einzelnen Mycelfäden in Berührung kommt, so daß diese eine intensivere Oxydationstätigkeit entfalten können, andererseits daran, daß in starken Myceldecken nur die oberflächlichen und die Randhyphen leben, die übrigen aber aus abgestorbenen Zellen bestehen[1]). Wahrscheinlich bilden sich ferner in wenig Stickstoff haltender Nährlösung Hyphengeflechte von geringem Stickstoffgehalt, welcher dem Stickstoffgehalte der Nährlösung proportional sein dürfte, wie ähnliches für Bierhefe feststeht[2]). Geringer Stickstoffgehalt des Mycels scheint günstig für die Erhaltung der Citronensäure zu sein, welche sonst weiter zu Kohlendioxyd oxydiert wird.

---

[1]) Vgl. Panatelli, Botan. Zeitg. II, Abt. 65, 75.

[2]) Vgl. H. Pringsheim, diese Zeitschr. 3, 221, 1907.

Zeitpunkt der höchsten Säurebildung.

Für die Beurteilung des Vorganges der Citronensäuregärung war es von Wichtigkeit, festzustellen, wann die Bildung dieser Säure ihren Höhepunkt erreicht; dieser Zeitpunkt mußte dann auch der geeignetste sein, um die Organismen auf ihren etwaigen Enzymgehalt zu untersuchen. Gleichzeitig haben wir untersucht, wie sich der Stickstoffgehalt einer stickstoffarmen Lösung während des Wachstums der Mycelien verhält. Zunächst zeigte sich in letzterer Hinsicht, daß der Stickstoffgehalt der Lösung schon in der ersten Woche sehr stark herabsinkt, z. B. von 0,025 % auf 0,008 bis 0,003 %; der letzte Rest an Stickstoff verschwindet aber nicht völlig, sondern bleibt auch nach Wochen ziemlich gleichmäßig erhalten, auch wenn noch eine langsame Zunahme des Mycelgewichtes zu konstatieren ist. Ähnlich wird nach M. Hayduck[1]) von Bierhefe der in einer Lösung vorhandene Stickstoffgehalt nur bis zu einer gewissen Konzentration ausgenützt. Darüber hinaus halten sich offenbar assimilierende und proteolytische Vorgänge das Gleichgewicht. Durch letztere wird aus älteren Teilen des Hyphengeflechtes so viel Stickstoffnahrung verfügbar gemacht, daß neues Mycel heranwachsen kann. Die Citronensäurebildung setzte deutlich erst nach $1^1/_2$ Wochen ein, nachdem also das Mycel der Hauptsache nach herangewachsen und der Stickstoffgehalt der Nährlösung auf das erwähnte Minimum gesunken war. Die höchste Intensität der Säurebildung, berechnet auf 1 g Mycel und auf 1 Tag, wurde sowohl ohne als mit Kreide zwischen dem 10. und 14. Tage der Kultur beobachtet.

Diese Resultate bilden eine vollkommene Bestätigung der Angaben von Mazé und Perrier[2]), welche ebenfalls gefunden haben, daß die Citronensäurebildung erst dann erheblich wird, wenn aus der stickstoffarmen Nährlösung die Hauptmenge des Stickstoffs bereits verschwunden und die Mycelentwicklung schon ziemlich weit vorgeschritten ist.

Kohlendioxydbildung durch die Citromyceten.

Ein weiterer Aufschluß über die Vorgänge bei der Citronensäurebildung ließ sich durch Bestimmung des gleichzeitig

[1]) Zeitschr. f. Spiritusindustrie 13, 173, 1881.

[2]) Annales de l'Inst. Pasteur 18, 561, 1904.

gebildeten Kohlendioxyds gewinnen. Aus Traubenzucker entstehen, wie sich ergab, durch die Citromyceten außer Citronensäure und dem eben erwähnten Gase keine weiteren Stoffwechselprodukte in nennenswerter Menge, ein Befund, der sich mit den Angaben von Wehmer und von Mazé deckt. Wir haben besonders die Abwesenheit von Alkohol, Essig-, Milch-, Oxal- und Bernsteinsäure festgestellt.

Wird bei den Versuchen die Menge des verbrauchten Zuckers bestimmt, kann man aus der gebildeten Citronensäure und dem entwickelten Kohlendioxyd berechnen, wie sich die verschwundene Glucose auf jene zwei Produkte verteilt; der Rest an verbrauchtem Kohlenhydrat ist zur Erhöhung des Mycelgewichtes verwendet worden. Vorausgesetzt muß dabei noch werden, daß nach der Gleichung

$$\text{I.} \qquad C_6H_{12}O_6 + 3\,O = C_6H_8O_7 + 2\,H_2O$$

ein Molekül Citronensäure einem Molekül Zucker entspricht, wenn auch an einen direkten Übergang durch Oxydation, wie ihn diese Formulierung anzudeuten scheint, der verzweigten Kohlenstoffkette der Säure halber nicht zu denken ist. Ferner liefert ein Molekül Glucose bei vollständiger Oxydation 6 Moleküle Kohlendioxyd:

$$\text{II.} \qquad C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O.$$

In den Fällen, bei welchen Kreide zugesetzt wurde, stammt ein Teil des entwickelten Kohlendioxyds aus jener. Mit Hilfe einer einfachen Überlegung, welche im experimentellen Teil wiedergegeben werden soll, läßt sich aber auch hier ermitteln, wieviel von der Gesamtmenge des Kohlendioxyds direkt aus dem Zucker oder aus vorher gebildeter Citronensäure stammt.

Was zunächst die Versuche bei Gegenwart von Calciumcarbonat betrifft, so blieb der Anteil des verschwundenen Zuckers, welcher als Kohlendioxyd wieder erscheint, während der vierwöchigen Versuchsdauer ziemlich konstant (48 bis 62 %). Dagegen steigt der Prozentsatz des verbrauchten Zuckers, welcher als Citronensäure erhalten wird, im allgemeinen an; der Anteil des Zuckers, der im Mycelgewicht auftaucht, nimmt stark ab, so daß schließlich nach 4 Wochen nur 5 % des verbrauchten Zuckers auf das Mycelgewicht treffen, alles andere in Kohlen dioxyd und Citronensäure übergegangen ist. Dieses Ergebnis macht wahrscheinlich, daß bei längerer Versuchsdauer, zumal

wenn wie in dem vorliegenden Versuch der Zuckervorrat der Nährlösung der Erschöpfung entgegengeht, Teile des Mycels in Kohlendioxyd oder in Citronensäure verwandelt werden. Bei den Versuchen ohne Kreide erscheint ein beträchtlich höherer Prozentsatz des Zuckers als Kohlendioxyd wieder, besonders nach längerer Gärdauer; der Anteil des Kohlenhydrats, welcher in Form von Citronensäure auftritt, bleibt erst konstant und nimmt dann im Laufe der Gärung ab, weil offenbar allmählich ein Teil der gebildeten Säure noch weiter zu Kohlendioxyd verbrannt wird; die Prozente an Zucker, welche zum Aufbau des Mycels Verwendung gefunden haben, sinken im Laufe der Zeit deutlich herunter, aber langsamer wie bei den Parallelversuchen mit Calciumcarbonat. Nach 4 Wochen sind 77 % des verbrauchten Zuckers als Kohlendioxyd aufgetreten, nur 8 % als Citronensäure und 15 % als Vermehrung des Mycelgewichtes, wogegen bei den Kreideversuchen 62 % des verschwundenen Zuckers als Kohlendioxyd und nur 5 % als Mycelgewichtszunahme, aber 33 % als Citronensäure erscheinen. Das heißt, der Teil des Zuckers, welcher bei Kreidegegenwart als Citronensäure auftritt, findet sich bei Abwesenheit dieses Stoffes hauptsächlich eben als Kohlendioxyd wieder.

Citronensäuregärung im Vakuum.

Obwohl die Umwandlung von Zucker in Citronensäure auf einen Oxydationsvorgang hinausläuft, haben doch Mazé und Perrier[1]) beobachtet, daß normal herangewachsenes Pilzmycel auch im luftleeren Raum Citronensäure zu liefern vermag. In der Tat ist es auch uns in einigen Fällen gelungen, diese Angabe zu bestätigen. Dabei verschwand ein beträchtlicher Teil des Pilzmycels, z. B. 40 % desselben; neben Citronensäure konnten auch wir Kohlendioxyd und kleine Mengen von Äthylalkohol nachweisen.

Über den Mechanismus der Citronensäurebildung aus Glucose.

Will man sich eine Vorstellung machen, auf welchem Wege etwa die Citronensäure mit ihrer verzweigten Kohlenstoffkette aus der normalen sechsgliedrigen Kohlenstoffkette des Trauben-

[1]) Annales de l'Inst. Pasteur 18, 569, 1904.

zuckers entstehen kann, so muß zunächst an eine Synthese nach L. Claisen und Hori[1]) gedacht werden. Die Bildung von Essig und Oxalsäure aus Zucker durch die mannigfachsten Mikroorganismen ist erwiesen. Auch aus Mannit, aus Glycerin und selbst aus Äthylalkohol, aus welchen Substanzen die Citromyceten nach Mazé ebenfalls Citronensäure zu liefern vermögen, kann man sich diese beiden Säuren ohne jede theoretischen Schwierigkeiten entstanden denken. Nach W. Wislicenus[2]) verbinden sich nun Essig- und Oxalsäureester bei Gegenwart von Nairiumäthylat zu Oxalessigester; Claisen und Hori haben dann gezeigt, daß aus diesem Produkt bei Gegenwart von Kaliumacetat schon bei gewöhnlicher Temperatur der Ester der Aconitsäure zu erhalten ist, welche das Kohlenstoffskelett der Citronensäure aufweist und dieser Säure überhaupt außerordentlich nahesteht. Die letztgenannten Forscher sprechen selbst die Vermutung aus, daß dies vielleicht der Weg sei, auf welchem die Citronensäure in den Pflanzen entsteht. Durch Formeln läßt sich jene Kondensation, wenn man von der Anwendung der Ester anstatt der freien Säuren und von dem Auftreten von Zwischenprodukten absieht, am einfachsten in folgender Weise wiedergeben:

```
Essigsäure   Essigsäure
  COOH         COOH                COOH    COOH
  | /H         | /H                 |       |
  C—H          C—H                 CH2     CH2
   \H           \H      = H2O +      \     /
          O                           COH
         //                            |
         C—OH                         COOH
         |
         COOH
       Oxalsäure                   Citronensäure
```

Eine experimentelle Prüfung dieser Hypothese schien möglich, da, ihre Richtigkeit vorausgesetzt, Essig- und Oxalsäure in kleinen Mengen gute Nährstoffe für Citromyceten vorstellen und zu erheblicher Citronensäurebildung führen müßten. Alle Versuche in dieser Richtung, deren Einzelheiten sich im experi-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 24, 120, 1891.

[2]) Liebigs Annal. d. Chem. 246, 315, 1888.

mentellen Teil vorfinden, sind jedoch negativ verlaufen. Eine Synthese der Citronensäure durch die Citromyceten im Sinne von Claisen und Hori ist demnach nicht wahrscheinlich.

Eine höchst interessante Annahme über den Weg der Citronensäurebildung stammt von Mazé und Perrier.[1]) Danach verwandeln die Pilze zunächst den Zucker unter dem Einfluß einer Zymase in Kohlendioxyd und Äthylalkohol, welch letzterer sich bei Versuchen im Vakuum, wie wir bestätigen können, tatsächlich nachweisen läßt. Auch aus Mannit und aus Glycerin könnte dieses Zwischenprodukt entstehen. Der Alkohol soll dann von den Zellen aufgenommen und der lebenden Substanz einverleibt werden. Sobald aber der Stickstoffgehalt der Nährlösung erschöpft ist, trete eine proteolytischer Prozeß ein, wobei das Plasma der gealterten Zellen zerfällt, unter Abgabe von Stickstoffnahrung für die jungen Hyphen und Bildung von Citronensäure. Letztere wäre in irgend einer Weise in dem hochmolekularen Plasma schon vorgebildet und erscheine nun als Produkt eines autolytischen Verdauungsvorganges, einer Disassimilation.

Diese Hypothese erinnert an die schöne Aufklärung der Fuselölbildung bei der alkoholischen Gärung des Zuckers durch F. Ehrlich[2]), welcher zeigte, daß z. B. Leucin unter dem Einfluß der Saccharomyceten unter Kohlendioxydabspaltung und Ersatz der Amino- durch eine Hydroxylgruppe, also unter Ammoniakentwicklung, in Amylalkohol übergeht, nach der allgemeinen Gleichung:

$$R.CH(NH_2).COOH + H_2O = CO_2 + NH_3 + R.CH_2(OH).$$

Einen ähnlichen Vorgang der Fuselölbildung hat dann neuestens H. Pringsheim[3]) bei verschiedenen Mycelpilzen nachgewiesen. Im Sinne der Annahme von Mazé und Perrier konnte man nun vermuten, daß die Citronensäure auf ähnlichem Wege aus hochmolekularen Eiweißkörpern des Plasmas entstanden und speziell die Hydroxylgruppe am tertiären Kohlenstoffatom an Stelle einer Aminogruppe getreten sei. Um diese Vorstellung experimentell zu stützen, haben wir untersucht, ob die Citromyceten aus Leucin Fuselöl zu bilden vermögen. Aber

[1]) Annales de l'Inst. Pasteur 18, 557, 1904.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 4072, 1906.

[3]) Diese Zeitschr. 3, 276, 1907; 8, 128, 1908.

trotzdem die Kulturen üppiges Wachstum zeigten und die Aminosäure vollständig aus der Nährlösung verschwand, konnte kein Amylalkohol nachgewiesen werden; die Citromyceten sind unfähig zu einer derartigen Spaltung (die ausführliche Beschreibung der Versuche findet sich im experimentellen Teil).

Will man an der auch uns wahrscheinlichen Annahme, daß die Citronensäure von einem synthetisch aus Zucker entstandenen Produkt abstammt, festhalten, so bietet sich noch eine andere Möglichkeit zur Erklärung des Vorganges. Nach H. Kiliani[1]) liefert Milchzucker, mit gelöschtem Kalk in wässeriger Lösung einige Wochen bei gewöhnlicher Temperatur aufgestellt, neben anderen Stoffen auch sog. Parasaccharinsäure, welche das Kohlenstoffskelett der Citronensäure aufweist:

Parasaccharinsäure	Citronensäure
$CH(OH).CH_2(OH)$	$CH_2.COOH$
|	|
$C(OH).COOH$	$C(OH).COOH$
|	|
$CH_2CH_2(OH)$	$CH_2.COOH$

und durch geeignet geleitete Oxydation unter Verschiebung einer Hydroxylgruppe in letztere Verbindung überführbar sein dürfte. Den Weg, auf welchem diese Synthese, von der sechsgliedrigen normalen Kohlenstoffkette eines Monosaccharids ausgehend, erfolgen wird und der auf eine Spaltung in Tetrose und Glycolaldehyd und darauffolgende Kondensation dieser beiden, aber ohne jede Oxydation hinausläuft, hat A. Windaus[2]) näher erörtert. Von Fr. Knoop und A. Windaus[3]) wurde ferner darauf hingewiesen, daß die Citronensäure in der Milch möglicherweise dem gleichen synthetischen Vorgang entstammt. Spielen sich nun ähnliche Reaktionen in den Citromyceten ab, so könnte die Citronensäurebildung über Parasaccharinsäure oder einen Abkömmling derselben verlaufen, überhaupt über einen Körper, welcher der Zuckergruppe nahe und vielleicht in Beziehungen zu den hochmolekularen Kohlenhydraten der Zellmembranen steht. Der Nachweis einer solchen Substanz ist allerdings bisher nicht geführt; wir haben als Reservestoff

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 37, 1201, 1904.

[2]) Chem.-Zeitg., Köthen 29, 564, 1905.

[3]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 394, Anm., 1905.

in Citromyceten bisher nur Mannit aufgefunden, worüber im Abschnitt: Preßsaft und Dauerpräparate näher berichtet werden soll.

Bedeutung der Citronensäuregärung für die Organismen.

Schon Wehmer[1]) weist darauf hin, daß die Citronensäurebildung aus Zucker einer mehr oder minder unökonomischen Nutzung des Substrates entspringt. Wie die oben wiedergegebenen Gleichungen I und II zeigen, werden auf 1 Molekül Zucker bei Oxydation zu Citronensäure nur 3 Atome Sauerstoff, bei völliger Verbrennung zu Kohlendioxyd 12 Atome, also die vierfache Menge verbraucht. Die Citronensäuregärung bietet somit vom Standpunkt der Gewinnung von Energie keinen Vorteil für die Pilze. Auch als Kampfstoff im Sinne Wortmanns hat zum Unterschiede von Essig- und Oxalsäure die Citronensäure wenig Wert. Viele Bakterien werden durch diese Säure kaum geschädigt[2]) und für manche Schimmelpilze stellt sie direkt ein gutes Nährmittel vor.

Die Citronensäurebildung ist, wie bereits Wehmer fand, nicht notwendig mit dem Wachstum der Citromyceten verknüpft und auch im Falle ihres Auftretens erscheint sie bei Abwesenheit von Kreide nur als Durchgangsprodukt der Oxydation, als Resultat einer unvollständigen Veratmung. In Übereinstimmung mit Mazé und Perrier[3]) konnten auch wir feststellen, daß ihr Auftreten mit der Menge des Stickstoffs in der Nährlösung zusammenhängt und eine gewisse Stickstoffarmut zur Vorraussetzung hat. Die französischen Forscher erklären diesen Zusammenhang damit, daß bei Stickstoffmangel die zum Aufbau neuen Mycels nötige Stickstoffnahrung dem Protoplasma alternder Zellen auf proteolytischem Wege entnommen werde und nebenher Citronensäure entstehe, eine Auffassung, die durch unsere Versuche über Einwirkung der Citromyceten auf Leucin nicht an Wahrscheinlichkeit gewonnen hat. Wir bevorzugen die Annahme, daß es sich bei der Citronensäurebildung um die Umwandlung von den Kohlenhydraten und speziell der Parasaccharinsäure nahestehenden Stoffen handelt. Der nachgewiesene

---

[1]) Lafar, Handb. d. Mykologie 4, 248, 1906.

[2]) A. Maaßen, Arbeiten d. Kaiserl. Gesundh.-Amtes 12, 390, 1895

[3]) Compt. rend. 139, 311, 1904.

Zusammenhang des Auftretens der Citronensäure mit dem Herabsinken des Stickstoffgehaltes der Nährlösung bietet auch dann der Erklärung keine Schwierigkeit. Entweder wird man annehmen, daß die durch mangelhafte Stickstoffnahrung geschwächten Citromyceten im allgemeinen die Fähigkeit verloren haben, Citronensäure rasch und vollständig zu verbrennen, wie auch andere Gärungserreger unter ungünstigen Umständen ihr Gärvermögen einbüßen; es bleibt sodann ein Zwischenprodukt des Atmungsvorganges wenigstens einige Zeit erhalten. Oder man wird sich erinnern, daß nach M. Hayduck mit steigendem Stickstoffgehalt der Hefe eine Zunahme der Gärkraft, also offenbar eine Anreicherung an Gärungsenzymen stattfindet. Bei mangelhafter Stickstoffnahrung wachsende Citromyceten werden arm an Stickstoff sein und in Analogie zu Hayducks Beobachtungen wohl auch weniger Enzyme enthalten; es können dann gerade die Enzyme fehlen, welche die Weiteroxydation der Citronensäure auslösen.

Die Citronensäurebildung im luftverdünnten Raum erfolgt nicht auf Kosten von Zucker der Nährlösung, sondern auf Kosten von Teilen des Pilzmycels, welches dabei beträchtlich an Gewicht abnimmt. Vielleicht wird der für den Übergang in Citronensäure wohl notwendige Sauerstoff einem anderen Anteil der Inhaltsstoffe der Citromyceten entzogen, welcher dabei reduziert wird, ähnlich wie wir als Reservestoff in diesen Mikroorganismen Mannit, offenbar entstanden durch Reduktion von Traubenzucker, angetroffen haben.

Die Eigenschaft der Citronensäurebildung läßt sich dadurch erklären, daß die Citromyceten ursprünglich nur in südlichen Ländern heimische Parasiten der Citrusarten (Apfelsine, Citrone) gewesen sind. Sie haben sich daran gewöhnt, Citronensäure in hohen Konzentrationen statt Zucker zu assimilieren, und, wie noch heute systematisches Umzüchten auf starken Citronensäurelösungen ihre Fähigkeit zur Citronensäurebildung erhöht, diese besondere Eigenschaft im Laufe vieler Generationen auf citronensäurehaltigen Früchten (Citronensaft enthält 7 bis 9 % Säure [1])) erworben.

---

[1]) F. Czapek, Biochemie der Pflanzen 2, 436, 1905.

Preßsaft und Dauerpräparate aus C. citricus.

Trotz einer ziemlich großen Anzahl von Versuchen, deren Anordnung sich im experimentellen Teil näher beschrieben findet, ist es bisher nicht gelungen, die Citronensäuregärung auf zellfreiem Wege oder mit getöteten Dauerpräparaten durchzuführen. Zur Erklärung dieser Tatsache liegen drei Möglichkeiten vor. Zunächst kann sie vielleicht in der geringen Genauigkeit der Citronensäurebestimmung zu suchen sein, welche kaum gestattet, kleine Mengen dieser Substanz nachzuweisen. Dann kann sie aber auch mit der Kompliziertheit des Vorganges zusammenhängen, der jedenfalls durch verschiedene Enzyme bewerkstelligt werden müßte; erleidet nur ein einziges von diesen bei der Tötung der Mycelien eine Schädigung, so scheint das Gelingen der ganzen Reaktion in Frage gestellt. Endlich ist aber auch denkbar, daß die Citronensäurebildung durch Citromyceten überhaupt nicht auf eine verhältnismäßig einfache Enzymwirkung hinausläuft, sondern wirklich untrennbar mit den Lebensvorgängen der Organismen zusammenhängt; solange das Gegenteil nicht erwiesen ist, wird man, um den Boden der exakten Forschung nicht zu verlassen, auch mit dieser Möglichkeit zu rechnen haben.

Zur Herstellung der getöteten Dauerpräparate wurden die Mycelien von C. citricus in Aceton eingetragen. Es verdient einiges Interesse, daß es uns gelungen ist, in diesem Aceton die Anwesenheit von drei verschiedenen Stoffen nachzuweisen, nämlich von Mannit, von einem cholesterinähnlichen Körper, wahrscheinlich Isocholesterin, und von Fett. Dieser Befund zeigt, daß die Tötung des Mycels durch Aceton durchaus nicht bloß auf einer Wasserentnahme beruht, sondern auf einer Entziehung von Substanzen, deren Anwesenheit zur Wiederaufnahme der Lebensfunktionen unentbehrlich ist. d-Mannit — es handelt sich auch im vorliegenden Falle um diese optisch-aktive Modifikation — findet sich nach Czapek[1]) bei niederen und höheren Gewächsen äußerst verbreitet und übertrifft unter anderem bei Pilzen an Quantität oft den Traubenzucker. Das Vorkommen dieses Stoffes, des Reduktionsproduktes der Glucose, bei Citromyceten beweist, daß in letzteren Orga-

[1]) Biochemie der Pflanzen 1, 212.

nismen unter Umständen auch eine reduzierende Wirkung eintritt; vielleicht kann der Traubenzucker als Oxydationsmittel funktionieren, wobei er selbst reduziert wird. Da nach Mazé und Perries Mannit von Citromyceten auch assimiliert wird, handelt es sich dabei um einen richtigen Reservestoff.

Nachschrift bei der Korrektur. Veranlaßt durch das Erscheinen der Dissertation von H. Wüstenfeld haben R. O. Herzog und A. Polotzky soeben eine kurze Mitteilung über Citronensäuregärung veröffentlicht[1]). Die Untersuchungen dieser Forscher scheinen, soweit sie sich nicht in ganz anderer Richtung bewegten, zu ähnlichen Ergebnissen geführt zu haben, wie die unseren.

Experimentelles.

Zu den Versuchen fanden folgende Nährlösungen Anwendung:

A. Mit anorganischer Stickstoffquelle: 1. Nährlösung nach Wehmer[2]): 0,35 % Stickstoff in Form von 1,0 % NH_4NO_3, 0,5 % KH_2PO_4, 0,25 % $MgSO_4 + 7$ aq., 0,1 % NaCl, unter Zusatz von 20 % Traubenzucker.

2. Raulinsche Lösung.

3. Anorganische Nährlösung, hergestellt aus dem Glührückstand des Absuds von weißen Bohnen (0,09 % Glührückstand) mit Traubenzuckerzusatz und Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle.

B. Mit organischer Stickstoffquelle:

4. Dunkle ungehopfte Bierwürze mit ca. 18 % Maltosegehalt, 0,15 % Stickstoff und 0,4 % Salzen. Dieselbe wurde bei den Versuchen mehrfach verdünnt angewandt.

5. Absud von grünen unreifen Bohnen, wie sie zur Herstellung von grünem Gemüse verwendet werden, von 0,04 % Glührückstand und 0,02 % Stickstoff.

6. Absud von getrockneten weißen Bohnen, hergestellt nach Mazé[3]), enthaltend 0,09 % Glührückstand und 0,02 % Stickstoff. Man erhitzt 100 g weiße getrocknete Bohnen mit 1 l Wasser zu gelindem Sieden, nur so lange, daß ein Zerplatzen der einzelnen

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 59, 125, 1909.
[2]) Botan. Zeitg. 41, 272, 1891.
[3]) Annales de l'Inst. Pasteur 18, 561, 1904.

Bohnen und eine Trübung der Flüssigkeit durch Stärkekörner vermieden bleibt; hiernach wird auf 1 l aufgefüllt und filtriert.[1])

Auf den Lösungen mit anorganischer Stickstoffnahrung entwickeln die Citromyceten außerordentlich kräftige, gewellte Decken mit unbedeutender Sporenbildung. Schon nach einigen Tagen tritt im Substrat freie anorganische Säure auf, wahrscheinlich Salpetersäure, entstanden durch Assimilation des Ammoniaks aus dem Ammoniumnitrat. In konzentrierter Bierwürze entwickeln sich die Citromyceten anfangs langsam, nach einigen Wochen entstehen jedoch sehr dicke, stark gefaltete Mycelien. Sporenbildung tritt erst spät ein. Der Absud von weißen Bohnen überzieht sich auf der Oberfläche schon am dritten Tage nach der Aussaat mit einer dünnen weißen Mycelschicht, welche bald unter reichlicher Sporenbildung ergrünt.

Die zu den Züchtungen verwendeten Gefäße waren folgende: 1. Weithalsige Erlenmeyer-Kolben zu 500 ccm Inhalt (15,5 ccm Höhe, 10,5 cm Durchmesser am Boden und 4,5 cm Durchmesser des Halses). Bei Anwendung von 100 ccm Nährlösung zeigten sich diese Gefäße wegen der relativ großen Oberfläche der Flüssigkeit und dem durch den weiten Hals begünstigten Sauerstoffzutritt als besser geeignet wie Stehkolben. 2. Kleine Erlenmeyer-Kölbchen von 100 ccm Inhalt. 3. Große Glasschalen von 37,5 cm Durchmesser und 11,5 cm Höhe, in welchen 1,5 bis 3 l Nährlösung nur eine 1 bis 3 cm hohe Schicht bildeten; diese angewandt zur Züchtung der Mycelpilze in größerem Maßstab.

Die Nährlösungen wurden in den Gefäßen mit Wattestopfen verschlossen und durch zweimalige Erhitzung im strömenden Dampfe, je 20 bis 30 Minuten lang, sterilisiert. Bei den Versuchen mit Calciumcarbonat wurde diese Substanz, wenn angängig, schon vor dem Erhitzen, sonst nachher in sterilem Zustande zugesetzt. Auch die großen Glasschalen wurden mit der Nährlösung gefüllt, darauf mit einer Watteschicht zwischen zwei Nesseltüchern bedeckt, welche wieder zwischen passenden Holzringen eingeklemmt waren, und hierauf erhitzt.

Alle Versuche fanden bei Zimmertemperatur statt; die Kulturen waren vor direktem Sonnenlicht geschützt.

Über das verwendete Pilzmaterial ist schon oben berichtet. Die Bestimmung des Mycelgewichtes fand nach 48stündigem

[1]) Gütige Privatmitteilung von Herrn Mazé.

Trocknen im Dampfschrank bei 98° statt, wobei die frischen Mycelien über die Hälfte und die lufttrockenen 10% ihres Gewichtes Wasser verlieren. Von Calciumcitrat durchsetzte Mycelien werden vorher durch Behandlung mit verdünnter Salzsäure davon befreit.

Die Bestimmung der Citronensäure erfolgte durch Ausfällung derselben in genau neutraler siedender Lösung als Calciumcitrat. Es fällt dabei das normale Salz mit 4 Molekülen Krystallwasser aus. Gelöste oder als Calciumcarbonat vorhandene Kohlensäure wird vorher durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure und kurzes Aufkochen entfernt. Da das Krystallwasser des Calciumcitrats kaum ohne Zersetzung des Salzes zu verjagen ist, und weil die Fällungen mitunter durch geringe Mengen von geronnenen Eiweißkörpern verunreinigt sind, haben wir vorgezogen, das getrocknete Calciumsalz im Platintiegel zu glühen und als Calciumoxyd zu wägen. Eine Anzahl von Kontrollversuchen[1]) zeigten, daß bei den Citronensäurebestimmungen keine größere Genauigkeit als bis auf etwa 10% zu erreichen ist, wie ähnliches auch von anderen Autoren erwähnt wird.[2])

Die Traubenzuckerbestimmungen wurden gewichtsanalytisch nach Pflüger[3]) unter Wägung des ausgefällten Cuprooxyds nach Auswaschen mit Alkohol und Äther und Trocknen im Toluolbad durchgeführt, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Bei vollständig parallelen Versuchen, besonders während der ersten Wochen der Züchtungen hervortretende erhebliche Unterschiede in der Entwicklung der Mycelien haben uns, nachdem sich die Dichtigkeit der Watteverschlüsse und die Größe der Sporenaussaaten nur von geringem Einfluß erwiesen[4]), zu der Erkenntnis geführt, daß die Verteilung der Sporen auf die Nährlösung bei der Aussaat insbesondere für die anfängliche Entwicklung der Kulturen von erheblicher Bedeutung ist. Später gleichen sich auch diese Fehlerquellen mehr und mehr aus. Durch einfaches Schütteln der Nährlösung ist keine günstige Verteilung der Sporen zu erzielen, weil sich dieselben

[1]) Siehe Wüstenfeld, Dissertation, Berlin 1908, S. 14.
[2]) Vgl. O. v. Spindler, Chem.-Zeitg. 27, 1263, 1903.
[3]) Arch. f. Physiol. 93, 163, 1902.
[4]) Siehe die Dissertation S. 24, 25.

nicht benetzen. Viel weniger treten diese Schwierigkeiten hervor, wenn man mit Calciumcarbonatzusatz arbeitet.

Das in folgendem wiedergegebene Tabellenmaterial umfaßt nur einen Teil der Untersuchungen; weitere finden sich in der oben erwähnten Dissertation.

Tabelle I.

Wachstum und Citronensäurebildung einiger Citromyceten.

Je 100 ccm Bierwürze bzw. Absud von weißen Bohnen, 20 % Maltose bzw. Glucose enthaltend, ohne oder mit Zusatz von Calciumcarbonat (je 5 g) wurden infiziert und die Kulturen 31 bzw. 36 Tage bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Calcium-carbonat	Versuchsdauer	Citromyces Pfefferianus (alte Kultur), gezüchtet auf Bierwürze			Citromyces Pfefferianus Originalstamm (Wehmer), gezüchtet auf Bierwürze			Citromyces citricus Originalstamm (Mazé), gezüchtet auf Absud von weißen Bohnen		
	Tage	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel
ohne	31	1,17	0,23	0,20	1,75	0,57	0,33	0,91	2,5	2,75
„	36	2,5	0,41	0,17	1,8	0,7	0,40	0,9	2,09	2,3
mit	36	2,66	1,48	0,56	1,89	2,48	1,31	1,06	4,1	3,87

Zunächst haben wir durch vergleichende Versuche mit einigen der uns zugängigen Citromyceten festgestellt, welcher Organismus für unsere Zwecke der geeignetste ist. Ausführliche Studien darüber liegen jedoch nicht vor, insbesondere keine, welche alle diese Mycelpilze auf derselben Nährlösung zur Vergleichung brächten. Tabelle I gibt drei Parallelversuche mit Citromyces Pfefferianus (alte Kultur), Citromyces Pfefferianus (Originalstamm) und Citromyces citricus (Originalstamm) ohne und mit Calciumcarbonat wieder. Jedesmal wurde das Mycelgewicht und die gebildete Citronensäure bestimmt und daraus die durch 1 g Mycel gebildete Säure berechnet. Die beiden Pfefferianusstämme wurden auf Bierwürze gezüchtet, so daß die Resultate direkt vergleichbar sind. Der Originalstamm erwies sich hinsichtlich der Säurebildung dem anderen gegenüber ohne und mit Calciumcarbonatzusatz sehr

überlegen, dagegen entwickelte er in derselben Zeit weniger Mycel. Der Originalstamm des C. citricus bildete in derselben Zeit aber außerordentlich viel mehr Säure und gleichzeitig eine geringere Menge Mycel, so daß die auf 1 g Mycel berechnete Menge Citronensäure das vielfache jener durch die Pfefferianusstämme gelieferten erreicht. Dabei muß aber sofort darauf hingewiesen werden, daß der C. citricus auf der günstigsten Nährlösung, nämlich einem Absud von weißen Bohnen gezüchtet worden war, während die Pfefferianusstämme auf Bierwürze heranwuchsen, so daß ein direkter Vergleich nur unter Vorbehalt statthaft ist.

Tabelle II.

Wachstum und Citronensäurebildung unter Anwendung derselben Nährlösung.

Je 50 ccm Absud von weißen Bohnen (0,02 % Stickstoff, 6,24 % Traubenzucker und 4 g Calciumcarbonat), bzw. 30 ccm Bierwürze (0,15 % Stickstoff, 18 % Maltose) unter Zusatz von noch 8 % Glucose und 3 g Calciumcarbonat, wurden infiziert mit Reinkulturen von C. Pfefferianus (alte Kultur), bzw. C. citricus, bzw. einem Citromyces, der sich auf einer verschimmelten Apfelsine vorgefunden hatte, und 14 Tage bzw. 38 Tage bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Calcium-carbonat	Versuchsdauer	Citromyces Pfefferianus (alte Kultur), gezüchtet auf Absud von weißen Bohnen			Citromyces citricus Originalstamm (Mazé), gezüchtet auf Absud von weißen Bohnen			Citromyces citricus Originalstamm (Mazé), gezüchtet auf Bierwürze			Citromyces von einer Apfelsine, gezüchtet auf Bierwürze		
	Tage	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel
mit	14	0,33	0,58	1,75	0,41	0,81	1,98	—	—	—	—	—	—
„	38	—	—	—	—	—	—	1,60	2,81	1,76	1,50	2,84	1,89

Zwei Versuche über Citronensäurebildung durch Citromyceten in derselben Nährlösung gibt Tabelle II wieder. Zunächst wurden hier verglichen: C. Pfefferianus (alte Kultur) mit C. citricus (Originalstamm), beide kultiviert auf Absud von weißen Bohnen. Nach allerdings nur 14tägiger Kultur mit Calciumcarbonat zeigte sich hier ein geringer Unterschied in der gebildeten

Säuremenge, berechnet auf 1 g Mycel. Dann sind verglichen C. citricus (Originalstamm) und ein Citromycet, welchem wir auf einer verschimmelten Apfelsine begegneten. Beide waren auf Bierwürze gezüchtet; nach 38 Tagen fand sich fast das gleiche Mycelgewicht und die gleiche Menge Säure gebildet. Dieses Ergebnis zeigt, daß dem in der Natur angetroffenen Organismus ähnliche Fähigkeiten zur Citronensäurebildung zukommen, wie dem C. citricus (Originalstamm).

Tabelle III.

Auffrischen des Citromyces Pfefferianus durch Umzüchten in Citronensäurelösungen.

Nachdem der Citromyces Pfefferianus (alte Kultur) 1 bis 5 Generationen in Absud von grünen Bohnen (0,02 % Stickstoff, 10 % Traubenzucker) unter Zusatz von 2 bis 20 % freier Citronensäure durchlaufen hatte, wurden Sporen davon übergeimpft auf 100 ccm Bierwürze (0,07 % Stickstoff, 9 % Maltose, 20 % Traubenzucker) mit und ohne Zusatz von Calciumcarbonat, und bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Ohne Calciumcarbonat						Mit Calciumcarbonat					
Versuchsdauer Tage	Aussaatmaterial, vorher umgezüchtet auf Citronensäurelösung vom Proz. Gehalt	Zahl der vorhergehenden Umzüchtungen	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Versuchsdauer Tage	Aussaatmaterial, vorher umgezüchtet auf Citronensäurelösung vom Proz. Gehalt	Zahl der vorhergehenden Umzüchtungen	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel
31	2	4	3,56	0,51	0,14	31	2	4	3,15	2,58	0,82
36	2	4	3,38	0,59	0,18	36	2	4	3,58	3,08	0,86
36	4	5	2,96	0,28	0,09	47	2	4	2,97	2,02	0,68
47	4	5	3,68	0,40	0,11	47	4	5	3,35	2,15	0,64
47	18[1])	1	1,96	0,85	0,43	47	12[1])	1	2,38	2,02	0,85
31	20[1])	1	1,36	1,34	0,98	47	18[1])	1	1,61	2,65	1,65
36	20[1])	1	1,41	1,39	0,99	31	20[1])	1	1,28	2,43	1,90
47	20[1])	1	1,36	1,55	1,14	36	20[1])	1	1,33	2,54	1,91
						47	20[1])	1	1,53	3,01	1,97
						47	20[1])	1	1,47	2,80	1,90

Es wurde nun eine Anzahl von Versuchen angestellt, um den C. Pfefferianus (alte Kultur) durch Umzüchten in geeigneten Lösungen wieder zur Citronensäurebildung anzuregen. Dabei zeigte sich, daß selbst vier- bis fünfmaliges Umzüchten

[1]) Diese Kulturen wurden ohne jeden Zuckerzusatz ausgeführt.

auf normalen zuckerhaltigen Nährlösungen, welche einen Zusatz von 2 bis 4% Citronensäure erhalten hatten, keinen nennenswerten Einfluß auf die Citronensäurebildung in gewöhnlicher Bierwürze ausübte. Anders verliefen aber eine Reihe von Versuchen, bei welchen derselbe Organismus nur einmal auf bis zu 20%iger Citronensäurelösung ohne Zuckerzusatz gewachsen war. Wurden Aussaaten davon nun in stark zuckerhaltiger Bierwürze gemacht, so erfolgte eine sehr gesteigerte Citronensäureproduktion, besonders bei Gegenwart von Calciumcarbonat, aber auch ohne dieses Neutralisationsmittel. Die Mycelgewichte blieben aber nunmehr bei weitem hinter den früher erhaltenen Mengen zurück. Die mit dergestalt aufgefrischtem C. Pfefferianus erzielten Mengen von Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel, standen nicht hinter jenen zurück, welche C. citricus (Originalstamm) und der Citromycet von einer Apfelsine unter ähnlichen Umständen nach Tabelle II lieferten.

Tabelle IV.

Umzüchten auf Bierwürze mit viel Citronensäure schädigt.

Die beiden Mycelpilze wurden innerhalb 8 Wochen dreimal umgezüchtet auf je 30 ccm Nährlösung, bestehend zu $^1/_4$ aus Bierwürze und zu $^3/_4$ aus einer 20%igen wässerigen Citronensäurelösung ohne Calciumcarbonat. Hernach wurde, sowohl von der ursprünglichen Kultur, als von den drei Umzüchtungen aus, Aussaatmaterial übertragen in 33 ccm Bierwürze unter Zugabe von je 3 g Calciumcarbonat. Die Verarbeitung der Versuche erfolgte nach 80 Tagen.

Calciumcarbonat	Versuchsdauer	Aussaat-Material	Citromyces citricus			Citromyces Pfefferianus (alte Kultur)		
			Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel
g	Tage		g	g		g	g	
3	80	Ursprüngliche Kultur	0,51	1,13	2,25	0,31	0,27	0,88
3	80	I. Umzüchtung	0,56	0,73	1,30	0,35	0,26	0,71
3	80	II. Umzüchtung	0,44	0,23	0,54	0,30	0,34	1,15
3	80	III. Umzüchtung	0,25	0,27	1,1	0,25	0,22	0,88

Merkwürdigerweise haben dagegen zwei Versuche mit C. citricus und C. Pfefferianus (alte Kultur) ergeben, daß mehrmaliges Umzüchten dieser Organismen in stark citronensäurehaltiger verdünnter Bierwürze die Wachstumsfähigkeit beider Pilze sehr herabsetzt. Beim Überimpfen in Bierwürze mit Calciumcarbonatzusatz wurden mit der Zahl der Umzüchtungen auf Citronensäurelösung abnehmende immer geringere Ernten erhalten, und die Mycelien zeigten nur ein geringes Citronensäurebildungsvermögen.

Nach diesen Ergebnissen scheint es, daß zum Auffrischen der Citromyceten durch Umzüchten in Citronensäurelösungen die Abwesenheit von Zucker von wesentlicher Bedeutung ist.

Die vergleichenden Versuche mit den verschiedenen Organismen hatten ergeben (siehe besonders die Tabellen I und II), daß C. citricus (Originalstamm) sich für die vorliegenden Zwecke besonders eignet. Wir haben uns daher im folgenden fast ausschließlich dieses Mycelpilzes bedient.

Tabelle V gibt eine Anzahl von Versuchen wieder, bei welchen der eben erwähnte Organismus auf Nährlösungen von annähernd gleichem Zucker-, aber verschiedenem Stickstoffgehalt und von verschiedener Herkunft der Stickstoffnahrung gezüchtet wurde. Es kamen zum Vergleich Absud von weißen Bohnen mit 0,02 °/₀ Stickstoff, Bierwürze mit 0,08 °/₀ Stickstoff und anorganische Nährlösung mit 0,35 °/₀ Stickstoff, alle mit etwa 8 °/₀ Zucker und ohne und mit Calciumcarbonat. Was zunächst die letztere Versuchsreihe mit Kreidezusatz betrifft, so haben Bierwürze und anorganische Lösung, also die Flüssigkeiten mit bedeutend höherem Stickstoffgehalt, viel größere Mycelgewichte als der Absud von weißen Bohnen geliefert. Innerhalb der hier verwendeten Differenzen im Stickstoffgehalt hat sich also ergeben, daß, je größer der letztere, desto stärker das Wachstum. In Hinsicht auf die gebildete Citronensäure liegt die Sache aber umgekehrt. Hier hat der stickstoffarme Absud von weißen Bohnen eine außerordentlich viel größere Ausbeute geliefert. In Bierwürze wurde wenig mehr als die Hälfte der Säure, in der anorganischen Nährlösung nur ungefähr ein Drittel gebildet. Berechnet man die entstandene Citronensäure auf 1 g Mycelgewicht, so ergab die stickstoffärmste Nährlösung die Verhältniszahl 2,5, die Bierwürze mit

mittlerem Stickstoffgehalt die Verhältniszahl 0,7 und die anorganische Nährlösung mit einem Stickstoffgehalt von 0,35% nur die Verhältniszahl 0,28. Wenn man also durch 1 g Mycel möglichst viel Citronensäure erzeugen will, muß eine stickstoffarme Nährlösung gewählt werden. Die Resultate der Versuche ohne Zusatz von Calciumcarbonat sind weniger deutlich, doch liegen auch hier die Verhältniszahlen für die Züchtungen auf Bohnenabsud am höchsten.

Tabelle V.

Nährlösungen von verschiedenem Stickstoff-, aber annähernd gleichem Zuckergehalt.

C. citricus ausgesät in je 100 ccm Nährlösung ohne bzw. mit Zusatz von Calciumcarbonat (je 5 g); untersucht, nachdem verschieden lang bei Zimmertemperatur gewachsen.

	Versuchsdauer	Absud von weißen Bohnen 0,02% Stickstoff 8,2% Traubenzucker			Bierwürze 0,08% Stickstoff 9% Maltose			Anorg. Nährsalze nach Wehmer 0,35% Stickstoff als NH_4NO_3 8% Traubenzucker		
		Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel
	Tage	g	g	Mycel	g	g	Mycel	g	g	Mycel
Ohne Calciumcarb.	24	0,76	0,34	0,45	2,84	0,41	0,15	2,43	0,19	0,08
	28	0,71	0,36	0,51	2,70	0,43	0,16	2,27	0,09	0,04
	34	0,86	0,38	0,44	2,95	0,13	0,04	2,14	0,18	0,08
	41	0,89	0,26	0,29	2,94	0,13	0,04	—	—	—
	47	0,90	0,36	0,40	2,77	0,24	0,09	—	—	—
	57	1,03	0,17	0,16	2,63	Spuren	—	—	—	—
Mit Calciumcarb.	24	0,91	1,55	1,70	2,58	1,73	0,61	3,46	0,33	0,09
	28	—	—	—	2,70	1,94	0,72	3,00	0,13	0.04
	34	0,91	2,28	2,50	2,71	1,90	0,70	2,70	0,75	0,28
	41	—	—	—	2,55	1,89	0.74	—	—	—
	57	1,20	3,08	2,56	2,55	1,88	0,73	—	—	—

Weitere Versuche (siehe Tabelle VI) dienten zum speziellen Vergleich des Bohnenabsuds mit anorganischer Nährlösung von gleichem und doppeltem Stickstoffgehalt. Überall wurden 10% Zucker zugesetzt und Versuche mit oder ohne Calciumcarbonat ausgeführt. Auch hier zeigte sich der Bohnenabsud, was die Citronensäurebildung betrifft, bei weitem überlegen.

Wenn gleichzeitig Kreide zugesetzt wurde, berechneten sich auf 1 g Mycel $2^1/_2$ bis $3^1/_2$ g Säure. Es ist demnach der organisch gebundene Stickstoff dem Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle sehr überlegen.

Tabelle VI.

Absud von weißen Bohnen und anorganische Nährlösung von demselben bzw. dem doppelten Stickstoff- und gleichem Zuckergehalt.

C. citricus ausgesät in je 100 ccm Nährlösung mit und ohne Zusatz von Calciumcarbonat (je 5 g), untersucht nach 42tägigem Wachstum bei Zimmertemperatur. Die anorganische Nährlösung wurde durch Eindampfen und Glühen desselben Bohnenauszugs erhalten und 0,05 bzw. 0,1 °/₀ Stickstoff in Form von Ammoniumnitrat zugefügt.

Calciumcarbonat	Versuchsdauer	Absud v. weißen Bohnen 0,05 % organisch gebundener Stickstoff 10 % Glucose			Anorg. Nährsalze 0,05 % Stickstoff (als NH_4NO_3) 10 % Traubenzucker			Anorg. Nährsalze 0,1 % Stickstoff (als NH_4NO_3) 10 % Traubenzucker		
	Tage	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure berechn. auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel
Ohne	42	0,57	0,14	0,25	0,51	0,15	0,30	—	0,05	—
Mit	42	0,43	1,49	3,47	—	0,69	—	0,65	0,62	0,95
„	42	0,44	1,15	2,61	—	0,51	—	—	0,76	—

Zwei Versuchsreihen (s. Tabelle VII) sollten entscheiden, wie sich der Absud von weißen Bohnen im Vergleiche mit Bierwürze verhält, wenn beide nur 0,02 % Stickstoff und 10 % Zucker enthalten. Bei Kreidezusatz entwickelte sich in Bierwürze ein etwas stärkeres Mycel; trotzdem blieb aber die Citronensäurebildung beträchtlich zurück gegenüber den Kulturen in Bohnenabsud. In letzterem lieferte 1 g Mycel 1,9 g Säure, in der Bierwürze nur 1,2 g. Die Versuche ohne Calciumcarbonat verliefen nicht so schlagend, doch wurden auch hier im Bohnenabsud etwas höhere Verhältniszahlen für die Säure erhalten.

Tabelle VII.

Absud von weißen Bohnen und Bierwürze bei gleichem Stickstoff- und Zuckergehalt.

C. citricus ausgesäet in je 100 ccm Nährlösung, ohne bzw. mit Calciumcarbonat (je 5 g), untersucht nach 2 bis 7 wöchentlichem Wachstum bei Zimmertemperatur.

Calciumcarbonat	Dauer der Versuche	Absud von weißen Bohnen 0,02 % Stickstoff 0,09 % Glührückstand 10 % Traubenzucker			Bierwürze 0,02 % Stickstoff 0,05 % Glührückstand 2,4 % Maltose 7,6 % Traubenzucker		
		Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Citronensäure berechnet auf 1 g Mycel
	Tage	g	g		g	g	
Ohne	14	0,66	0,29	0,45	0,75	0,21	0,28
Mit	46	0,70	0,29	0,41	0,85[1]	0,26[1]	0,31[1]
Mit	14	0,66	0,53	0,80	0,75	0,51	0,68
„	21	0,80	0,97	1,21	0,97	0,86	0,89
„	46	0,76	1,45	1,91	0,96	1,19	1,24

Die in den bisher besprochenen Tabellen aufgeführten Versuche zeigen deutlich, daß die An- oder Abwesenheit von Calciumcarbonat von größter Bedeutung ist. In den damit versetzten Kulturen beginnt die Ausscheidung von Calciumcitrat etwa nach 14 Tagen in Form von farblosen Drusen oder Krusten von strahlig-krystallinischem Gefüge. In einigen Fällen konnte auch das Entweichen von Kohlendioxydblasen direkt wahrgenommen werden. Die entstehende Citronensäure wird, soweit sie aus den Zellen heraustritt, auf diese Weise festgelegt. Ohne Anwesenheit von Caliumcarbonat kann bereits gebildete Citronensäure im Laufe der Zeit wieder verschwinden, wie z. B. einige Versuche der Tabelle V erkennen lassen. Es kommt deshalb in solchen Kulturen niemals zu einer so starken Anhäufung der Säure, wie bei Zusatz von Kreide, wofür auch die Zahlen der Tabellen I und III Belege liefern. Durch besondere Versuche haben wir uns überzeugt, daß sowohl C. citricus als C. Pfefferianus imstande sind, bei Abwesenheit von

[1]) Dieser Versuch wurde nach 21 Tagen unterbrochen.

Zucker Citronensäure zu zerlegen, offenbar unter Assimilation derselben (s. Tabelle VIII). Ein Zusatz von 2°/₀ Citronensäure war schon nach 27 Tagen völlig verbraucht, ein Zusatz von 5°/₀ Citronensäure nach 58 Tagen durch C. citricus zu zwei Drittel, durch C. Pfefferianus fast völlig verzehrt. Auch in 8°/₀iger Citronensäurelösung zeigte sich gutes Wachstum und ein rasches Verschwinden der Säure. C. Pfefferianus scheint gegen die freie Säure noch unempfindlicher als C. citricus zu sein.

Tabelle VIII.

Assimilation von Citronensäure durch Citromyceten bei Abwesenheit von Zucker.

Je 30 ccm Absud von grünen Bohnen (0,02 °/₀ Stickstoff, unter Zusatz von 2, bzw. 5, bzw. 8 °/₀ Citronensäure) wurden infiziert mit C. citricus und C. Pfefferianus (alte Kultur) und bei Zimmertemperatur aufgestellt. Die Versuche wurden nach 4 bis 8 Wochen unterbrochen und die zu den drei verschiedenen Zeitpunkten gebildeten Mycelien vereinigt und gewogen. Die in der Tabelle enthaltenen Zahlen geben diese gefundenen Mengen geteilt durch drei wieder, repräsentieren also die Durchschnittsgewichte der jedesmaligen drei Mycelien.

Calciumcarbonat	Dauer der Versuche	2 °/₀ Citronensäure (0,60 g)				5 °/₀ Citronensäure (1,53 g)				8 °/₀ Citronensäure (2,49 g)			
		C. citricus		C. Pfefferianus		C. citricus		C. Pfefferianus		C. citricus		C. Pfefferianus	
		Durchschnittl. Mycelgewicht	Verbrauchte Citronensäure	Durchschnittl. Mycelgewicht	Verbrauchte Citronensäure	Durchschnittl. Mycelgewicht	Verbrauchte Citronensäure	Durchschnittl. Mycelgewicht	Verbrauchte Citronensäure	Durchschnittl. Mycelgewicht	Verbrauchte Citronensäure	Durchschnittl. Mycelgewicht	Verbrauchte Citronensäure
	Tage	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
Ohne	27		völlig verbraucht		völlig verbraucht		0,87		0,78		0,37		0,64
„	42	0,14	„	0,13	„	0,16	0,80	0,20	0,92	0,14	0,54	0,17	0,73
„	58		„		„		0,98		fast ganz verbr.		0,65		0,99

Daß Citronensäure als einzige Kohlenstoffquelle zur Ernährung des C. citricus Verwendung finden kann, haben wir festgestellt durch Züchtung dieses Pilzes auf 50 ccm einer anorganischen Nährlösung aus dem Glührückstand des Absudes von weißen Bohnen, mit Ammoniumnitrat als Stickstoffnahrung. Nach 16 Tagen war 1,72 g Citronensäure, alle zugesetzte, verschwunden, dagegen gebildet 0,28 g Pilzmycel und 1,53 g Kohlendioxyd, so daß unter Zugrundelegung der Gleichung

$$C_6H_8O_7 + 9\,O = 6\,CO_2 + H_2O$$

64,6 % der Säure in Kohlendioxyd verwandelt, der Rest aber zum Aufbau des Mycels verbraucht worden war.

Eine merkwürdige Wirkung äußert der Calciumcarbonatzusatz noch insofern, als derselbe die gleichmäßige Verteilung der ausgesäten Sporen in der Nährlösung begünstigt, so daß es leichter ist, eine Reihe von Kolben mit kreidehaltiger Nährlösung einen wie den anderen zu infizieren, als Kolben ohne Calciumcarbonat. Diese Erscheinung dürfte damit zusammenhängen, daß die Kreide eine gleichmäßige Verteilung der Sporen in der Nährlösung beim Schütteln auf mechanischem Wege und vielleicht auch ihre Benetzbarkeit begünstigt.

Tabelle IX.

Höchstausbeuten an Citronensäure aus Zucker.

C. citricus, ausgesät in je 100 ccm Nährlösung von verschiedenem Zuckergehalt, unter Zusatz von je 5 g Calciumcarbonat, untersucht, nachdem 66 bzw. 57 Tage bei Zimmertemparatur gewachsen.

Calciumcarbonat	Dauer der Versuche	Traubenzucker	Absud von weißen Bohnen 0,02 % Stickstoff, 0,09 % Glührückstand					Calciumcarbonat	Dauer der Versuche	Traubenzucker	Absud von grünen Bohnen 0,02 % Stickstoff, 0,04 % Glührückstand				
			Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Verbrauchter Zucker	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Citronensäure, berechnet auf 1 g verbrauchten Zuckers				Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Verbrauchter Zucker	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Citronensäure, berechnet auf 1 g verbrauchten Zuckers
	Tage	%	g	g	g				Tage	%	g	g	g		
Mit	66	6,5	0,88	1,95	3,5	2,22	0,56	mit	66	6,5	0,80	1,23	2,9	1,53	0,43
„	57	8,2	1,20	3,08	5,7	2,57	0,54	mit	57	12,8	1,12	4,82	8,8	4,30	0,55

In einer Anzahl von Versuchen haben wir die Menge des bei der Mycel- und Citronensäurebildung verbrauchten Zuckers festgestellt. Insbesondere interessierte auch die Frage, wieviel Citronensäure auf 1 g verschwundenen Zuckers zu erhalten ist. In Tabelle IX sind vier Versuche zusammengestellt, welche uns die Höchstausbeuten an Citronensäure aus Zucker geliefert haben. Als Kulturflüssigkeiten kamen dabei der Absud von weißen und von grünen Bohnen mit 0,02 % Stickstoff zur Verwendung; überall wurde Calciumcarbonat zugesetzt. Auf 1 g verbrauchten Zuckers entstanden nach 8 bis 10 Wochen 0,54, 0,56, 0,55 und 0,43 g Citronensäure. Die beiden Nährlösungen erwiesen sich als ziemlich gleichwertig. Der Zuckergehalt, welcher von vorn-

herein zugesetzt wurde, betrug 6,5 bis 12,8 %; in der Lösung mit dem höchsten Zuckergehalt war bei weitem die größte Menge Zucker verbraucht und die größte Menge Citronensäure gebildet worden, während in den Mycelgewichten kein allzu großer Unterschied auftritt.

Durch eine Anzahl von Versuchen haben wir uns ferner klargelegt, welchen Einfluß die Konzentration der Lösung, insbesondere deren Stickstoffgehalt, und die Schichthöhe der Flüssigkeit bzw. die Formen der Kulturgefäße auf die Entwicklung des Mycels und die Citronensäurebildung ausüben. Es wurde dazu ein Absud von weißen Bohnen mit 0,06 % Stickstoffgehalt und dieselbe Flüssigkeit nach dreifacher Verdünnung mit Wasser, also von 0,02 % Stickstoffgehalt, angewandt. Die Kulturen erfolgten in weithalsigen Erlenmeyer-Kolben zu 500 ccm und in Erlenmeyer-Kölbchen zu 100 ccm Inhalt. Bei einem Teil der Versuche wurde Calciumcarbonat zugesetzt (s. Tab. X b), die anderen blieben ohne solches (s. Tab. X a). Vergleicht man zunächst in den Tabellen die mit den Nummern 1 bis 3 bezeichneten Spalten, welche die Kulturen mit der unverdünnten Nährlösung von 0,06 % Stickstoff wiedergeben, so zeigt sich, daß das Mycelgewicht fast ganz genau von der Menge des Gesamtstickstoffs in der Flüssigkeit abhängt. Die Kolben der Spalte 1 sind mit je 100 ccm der Nährlösung beschickt, während die Kulturen in Spalte 2 und 3 nur je 33 ccm der Flüssigkeit enthalten. Dementsprechend beträgt das Mycelgewicht der Kolben in Spalte 1 fast genau das Dreifache von jenem in den beiden andern Spalten. Auch die Citronensäurebildung ist in den Kolben der Spalte 1 beträchtlich größer als in jenen mit nur ein Drittel der Nährflüssigkeit, erreicht aber nicht immer das Dreifache. Besonders gute Citronensäurebildung ist in den Kolben der Spalte 2 mit gleichzeitigem Calciumcarbonatzusatz zu konstatieren, bei welchen sich in den verhältnismäßig großen Gefäßen nur 33 ccm Nährlösung befanden, so daß der Luftzutritt und die Neutralisationswirkung des Calciumcarbonats sehr erleichtert waren. Vergleicht man andererseits die Kulturen der Spalten 4 bis 6, welche auf das Dreifache verdünnte Nährlösung von nur 0,02 % Stickstoffgehalt enthalten, untereinander, so ergibt sich im großen und ganzen dasselbe. Bringt man ferner die Kolben der Spalte 1 mit jenen der Spalte 4, die Kolben der Spalte 2 mit jenen der

Spalte 5 und die Kölbchen der Spalte 3 mit jenen der Spalte 6 in Beziehungen, wobei immer die zuerst genannten eine Nährlösung von 0,06 % Stickstoffgehalt, die hernach angeführten eine nur 0,02 % Stickstoff haltende Nährflüssigkeit aufweisen, so ergibt sich bei den ersteren ein bedeutend erhöhtes, vielfach genau auf das Dreifache gesteigertes Mycelgewicht, wogegen die Citronensäurebildung berechnet auf 1 g Mycelgewicht ausnahmslos in den verdünnteren Lösungen die höheren Werte erreicht.

Tabelle Xa.

Einfluß von Stickstoffkonzentration und Höhe der Flüssigkeitsschichte auf Mycelgewicht und Säurebildung.

Je 100 bzw. 33 ccm Nährlösung (Absud von weißen Bohnen zu 0,06 % Stickstoffgehalt und derselbe auf das Dreifache verdünnt, also zu 0,02 % Stickstoffgehalt) wurden unter Zusatz von 10 % Zucker, ohne und mit Calciumcarbonat (5 g), in Erlenmeyer-Kolben (500 ccm Inhalt) bzw. ebensolchen -Kölbchen (100 ccm Inhalt) infiziert mit C. citricus und bei Zimmertemperatur 2 bis 6½ Wochen aufgestellt.

	Dauer der Versuche Tage	Nummer der Spalten	1	2	3	4	5	6
		Stickstoffgehalt und Volumen der Nährlösung, sowie Art des Kulturgefäßes	Kolben mit 100 ccm Lösung (0,06 % N)	Kolben mit 33 ccm Lösung (0,06 % N)	Kölbchen mit 33 ccm Lösung (0,06 % N)	Kolben mit 100 ccm Lösung (0,02 % N)	Kolben mit 33 ccm Lösung (0,02 % N)	Kölbchen mit 33 ccm Lösung (0,02 % N)
Ohne Calciumcarbonat	14	Mycelgewicht in g	2,15	—	0,74	0,66	—	—
		Citronensäure in g	0,21	—	0,13	0,29	—	—
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	0,10	—	0,17	0,43	—	—
	21	Mycelgewicht in g	2,34 2,38	0,75	0,75	—	—	—
		Citronensäure in g	0,15 0,10	0,12	0,07	0,35 0,29	—	—
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	0,05[1])	0,16	0,09	—	—	—
	31	Mycelgewicht in g	—	0,65	0,58	0,61 0,63	—	—
		Citronensäure in g	—	0,07	0,09	0,28 0,32	—	—
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	—	0,11	0,15	0,47[1])	—	—
	46	Mycelgewicht in g	1,64	—	0,55	0,70	0,39	—
		Citronensäure in g	0,25	—	0,07	0,29	Spur	—
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	0,15	—	0,13	0,41	—	—

Tabelle Xb.

Einfluß von Stickstoffkonzentration und Höhe der Flüssigkeitsschicht auf Mycelgewicht und Säurebildung.

Je 100 bzw. 33 ccm Nährlösung (Absud von weißen Bohnen zu 0,06 % Stickstoffgehalt und derselbe auf das Dreifache verdünnt, also zu 0,02 % Stickstoffgehalt) wurden unter Zusatz von 10 % Zucker, ohne und mit Calciumcarbonat (5 g), in Erlenmeyer-Kolben (500 ccm Inhalt (bzw. ebensolchen -Kölbchen (100 ccm Inhalt) infiziert mit C. citricus und bei Zimmertemperatur 2 bis $6^1/_2$ Wochen aufgellt.

	Dauer der Versuche Tage	Nummer der Spalten / Stickstoffgehalt und Volumen der Nährlösung, sowie Art des Kulturgefäßes	1 Kolben mit 100 ccm Lösung (0,06 % N	2 Kolben mit 33 ccm Lösung (0.06 % (N	3 Kölbchen mit 33 ccm Lösung (0,06 % (N	4 Kolben mit 100 ccm Lösung (0,02 % (N	5 Kolben mit 33 ccm Lösung (0,02 % (N	6 Kölbchen mit 33 ccm Lösung (0,02 % (N
Mit Calciumcarbonat	14	Mycelgewicht in g	2,15	0,72	0,74	0,66	0,26	0,24
		Citronensäure in g	0,83	0,66	0,26	0,53	0,34	0,21
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	0,39	0,92	0,35	0,80	1,31	0,88
	21	Mycelgewicht in g	2,53	0,89 0,78	0,78 0,77	0,80 0,80	0,41	—
		Citronensäure in g	1,16	0,74 0,72	0,50 0,37	0,94 1,00	0,47	—
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	0,46	0,87[1])	0,56[1])	1,21[1])	1,15	—
	31	Mycelgewicht in g	—	0,86	0,58 0,46	0,55 0,72	0,31	—
		Citronensäure in g	—	0,95	0,50 0,43	1,14 1,18	0,67	—
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	—	1,11	0,90[1])	1,81[1])	2,16	—
	46	Mycelgewicht in g	1,98	0,69	0,56 0,60	0,76	0,29	0,37
		Citronensäure in g	1,56	0,83	0,38 0,43	1,45	—	0,42
		Säure berechnet auf 1 g Mycel	0,78	1,20	0,71[1])	1,91	—	1,13

Besonders klar tritt dieselbe Erscheinung hervor, wenn man endlich die Versuche der Spalten 3 und 4, bei welchen die Versuchsflüssigkeiten denselben Gesamtstickstoffgehalt aufweisen, aber in Spalte 4 in dreifach verdünnterer Lösung, mit-

[1]) Berechnet auf den Durchschnitt der beiden Versuche.

einander vergleicht. Es zeigt sich in allen Fällen annähernd das gleiche Mycelgewicht; was aber die Säurebildung betrifft, so ist die verdünntere Lösung der konzentrierteren regelmäßig, ganz besonders aber bei Zusatz von Calciumcarbonat, weit überlegen. In der verdünnteren Lösung mit 0,02 % Stickstoff wird hier wieder durch 1 g Mycel 1,9 g Citronensäure gebildet.

Um demnach Pilzrasen von starker Wirksamkeit zu erzielen, muß man Nährlösungen von sehr geringem Stickstoffgehalt anwenden; als zweckmäßig empfiehlt es sich ferner, schalenförmige Kulturgefäße zu benützen, so daß die Nährlösung in denselben nur eine niedere Schicht mit großer Oberfläche bildet.

Es war dann die Frage zu beantworten, zu welchem Zeitpunkt die stärkste Säurebildung stattfindet. Darüber Aufschluß zu erhalten war wichtig, weil die Pilze gerade in jener Periode auf etwa vorhandene Enzyme untersucht werden mußten. Wir haben darüber eine größere Anzahl von Versuchen angestellt[1]), von welchen einige in Tabelle XI wiedergegeben sind. Eine größere Anzahl von Kolben wurden mit je 100 ccm Absud von weißen Bohnen (0,025 % Stickstoff) und 12 % Traubenzucker, ohne bzw. mit Calciumcarbonat, beschickt, sterilisiert und hierauf mit C. citricus geimpft. Bei diesen Versuchen wurde auch das Verhalten des Stickstoffs der Nährlösung verfolgt. Es zeigte sich, daß bei Verwendung einer stickstoffarmen Nährlösung in den ersten Tagen ein Verbrauch des Stickstoffs bis auf ein Minimum eintritt; z. B. geht der Gehalt von 0,025 % herunter auf 0,008 bis 0,003 %, welcher Rest im Verlauf der ferneren Wochen dann aber in gleicher Höhe erhalten bleibt, selbst wenn gleichzeitig das Mycelgewicht allmählich noch höher ansteigt, Die Citronensäurebildung setzt erst nach einigen Tagen ein und erreichte wieder nur bei den Versuchen mit Kreidezusatz eine angemessene Höhe. Der Zuckerverbrauch steigerte sich sowohl ohne, als mit Calciumcarbonat ziemlich regelmäßig. Was die Menge Citronensäure betrifft, welche durch 1 g Mycel gebildet wurde, so zeigt sich nur bei Kreidegegenwart ein annähernd gleichmäßiges Ansteigen. Bei Kreideabwesenheit tritt schon nach 3 Wochen eine sinkende Tendenz hervor, indem die gebildete Säure zum Teil wieder zerfällt. Entsprechend ist auch

---

[1]) Siehe H. Wüstenfeld, Dissertation, Berlin 1908, S. 37, 38 u. 41.

die auf 1 g Zucker berechnete Säuremenge ohne Calciumcarbonat nach 3 Wochen schon eine sehr geringe. Mit Calciumcarbonat bleibt diese Zahl vom 14. Tage ab dagegen ziemlich konstant. Endlich sind in den zwei letzten Spalten die im Tagesdurchschnitt entstandenen oder verschwundenen Mengen von Citronensäure aufgeführt, und zwar in der letzten Spalte berechnet auf 1 g Mycel. Es zeigt sich da, daß sowohl ohne als mit Kreide ein Maximum zwischen dem 10. und 14. Tage erreicht wird.

Tabelle XI.

Zeitpunkt der stärksten Säurebildung.

In weithalsigen Erlenmeyer-Kolben (500 ccm Inhalt) wurden je 100 ccm Absud von weißen Bohnen (0,025 $\%$ Stickstoff) mit 12,20 g Traubenzucker versetzt und ohne bzw. mit Zugabe von Calciumcarbonat (5 g) nach dem Sterilisieren mit C. citricus infiziert.

	Versuchsdauer Tage	Verschwundener Stickstoff g	Mycelgewicht g	Gebildete Citronensäure g	Verbrauchter Zucker g	Citronensäure, berechnet auf 1 g Mycel	Citronensäure, berechn. auf 1 g verbraucht. Zuckers	Zu- oder Abnahme an Citronensäure im Tagesdurchschnitt[1] g	Zu- oder Abnahme an Citronensäure im Tagesdurchschnitt[1] berechnet auf 1 g Mycel
Ohne Calciumcarbonat	5	0,017	0,36	0,02	0,3	0,06	0,074	+ 0,004	+ 0,012
	10	0,020	0,66	0,06	1,0	0,09	0,059	+ 0,008	+ 0,006
	14	0,022	0,76	0,28	2,7	0,37	0,104	+ 0,055	+ 0,070
	18	0,020	0,66	0,17	1,8	0,25	0,095	— 0,027	— 0,030
	21	0,021	0,82	0,13	2,3	0,16	0,055	— 0,013	— 0,030
	27	—	0,91	0,14	3,2	0,15	0,043	+ 0,002	— 0,002
	34	—	1,06	0,22	3,0	0,21	0,074	+ 0,011	+ 0,009
	41	—	1,06	0,10	3,2	0,09	0,030	— 0,017	— 0,017
	57	0,021	1,02	0,08	4,9	0,08	0,015	— 0,001	— 0,001
Mit Calciumcarbonat	5	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	0,49	0,17	2,3	0,35	0,075	+ 0,017[2]	+ 0,035
	14	0,019	0,58	0,47	2,6	0,81	0,18	+ 0,08	+ 0,115
	18	0,018	0,67	0,50	2,5	0,75	0,20	+ 0,01	— 0,015
	21	0,018	0,95	0,62	3,2	0,65	0,19	+ 0,04	— 0,033
	27	—	0,85	0,83	3,6	0,98	0,23	+ 0,04	— 0,055
	34	—	0,83	1,01	4,0	1,22	0,25	+ 0,03	+ 0,034
	41	—	0,84	1,09	4,2	1,29	0,26	+ 0,01	+ 0,010
	57	0,021	1,22	1,21	6,9	1,00	0,17	— 0,01	+ 0,018

[1]) Die Berechnung knüpft immer an den Zeitpunkt der letzten vorhergehenden Ermittlung der Citronensäure an; die in der Zeile „5 Tage" gegebene Zahl gibt den Tagesdurchschnitt der ersten 5 Tage, die in der Zeile „10 Tage" aufgeführte Zahl den Tagesdurchschnitt zwischen dem 5. und 10. Tage an usw.

[2]) Berechnet auf die ersten 10 Tage.

Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß gewisse Unregelmäßigkeiten in den Mycelgewichten und der Citronensäurebildung bei aufeinander folgenden Zeitpunkten darauf zurückzuführen sind, daß die Versuche nicht an demselben Kolben durchgeführt werden konnten, sondern für jeden ein neuer Kolben herangezogen werden mußte, und daß die Kolben in der Entwicklung, besonders bei Abwesenheit von Calciumcarbonat, immerhin gewisse Unterschiede untereinander zeigen. Die durch 1 g Mycelgewicht erhaltene Menge von Citronensäure erreichte hier auch bei Calciumcarbonatzusatz lange nicht die bei früheren Versuchen (vgl. besonders Tabelle IX) erzielte Höhe, was wahrscheinlich mit den hohen Sommertemperaturen zusammenhängt, bei welchen diese Kulturen in Gang waren.

Über die Bildung von Kohlendioxyd durch Citromyceten.

Die Bestimmung der Kohlensäure wurde in der Weise durchgeführt, daß ständig durch die Kolben Luft geleitet wurde. Dieselbe ging zuerst durch eine Waschflasche mit Kalilauge und dann durch ein kleines Gläschen mit Wasser, um sie mit Wasserdampf zu sättigen und die Geschwindigkeit des Stromes vergleichen und regulieren zu können, was mit Hilfe von Klemmschrauben annähernd gelang. Nachdem die Luft noch durch ein steriles Wattefilter von Mikroorganismen befreit war, trat sie von oben in die Kulturgefäße ein und wurde durch ein seitliches Ansatzrohr der letzteren dicht über den Pilzdecken abgeleitet. Der mitgenommene Wasserdampf wurde durch lange Chlorcalciumröhren zurückgehalten und das entwickelte Kohlendioxyd in einem Kaliapparat nach Liebig-Kyll aufgefangen. Da Kautschukschlauchverbindungen nur an zwei Stellen vorhanden waren und auch hier die Glasröhren direkt aneinander stießen, so waren auch bei tagelangem Betriebe des Apparates keine wesentlichen Gasverluste zu befürchten. Zwei blinde Kontrollversuche mit wassergefüllten Kulturgefäßen ergaben nach 4tägigem Luftdurchleiten lediglich eine Gewichtsabnahme des Kaliapparates um 1 bzw. 6 mg, nach 16tägigem Luftdurchleiten von 14 bzw. 12 mg, also Fehler, welche hier nicht in Betracht kommen. Das in Lösung befindliche Kohlendioxyd wurde vor Unterbrechung der Versuche jedesmal durch gelindes

Aufkochen in Freiheit gesetzt. Endlich überzeugten wir uns auch noch durch einen ausführlichen Versuch[1]), daß geringe Unterschiede in der Menge der durchgeleiteten Luft, sofern letztere überhaupt in großem Überschuß vorhanden ist, keinen Einfluß auf die Menge des gebildeten Kohlendioxyds besitzt.

In Tabelle XII sind die Kohlendioxydzahlen für 10 Kolben, beschickt mit je 50 ccm Absud von grünen Bohnen (0,05°/₀ Stickstoff) und 7°/₀ Traubenzucker, zusammengestellt. Die Hälfte der Kolben blieb ohne Kreide, bei den andern wurde solche zugesetzt. Durch alle Kolben wurde möglichst gleichmäßig Luft geleitet, nachdem dieselben mit C. citricus infiziert waren. Wenn man zunächst die Kohlendioxydmengen der Versuche ohne Calciumcarbonat ins Auge faßt, so zeigen sich nach 7 Tagen sehr beträchtliche Unterschiede zwischen den Kolben 1 bis 5, welche im weiteren Verlaufe der Versuche sich dann allmählich ausgleichen. Dieselben sind höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Verteilung der Sporen, welche zur Aussaat dienten, nicht gleichmäßig zu erzielen ist, sondern häufig Klümpchen derselben aneinander kleben bleiben; das führt dann zu einer unregelmäßigen Entwicklung des Mycels. Bei den Versuchen mit Calciumcarbonat (Kolben 6 bis 10) treten derartige Unterschiede bei weitem nicht in dem Maße hervor; auch schon nach 7 Tagen sind die Kohlendioxydmengen annähernd gleich; die ausgesäten Sporen lassen sich hier bei geringem Schütteln der infizierten Flüssigkeit leichter verteilen, sei es, daß sie mechanisch durch das Calciumcarbonatpulver voneinander getrennt werden, sei es, daß ihre Schwerbenetzbarkeit durch die Gegenwart der Kreide herabgesetzt wird. Überraschenderweise sind die Gesamtmengen an Kohlendioxyd ungefähr die gleichen, ob Kreide an- oder abwesend ist. Die bei der einen Reihe von Versuchen aus dem Calciumcarbonat durch die Citronensäure in Freiheit gesetzte Kohlensäure wird also in der andern Reihe ohne Kreide ersetzt durch auf anderm Wege entstandene. Das Maximum der täglichen Kohlensäurebildung fällt für beide Reihen zwischen den 7. und 11. Tag, zu welcher Zeit vermutlich die stärkste Mycelbildung vor sich geht. Von da ab zeigt sich ein ziemlich regelmäßiges Sinken der Kohlendioxydzahlen.

---

[1]) Siehe H. Wüstenfeld, Dissertation 1908, S. 43.

Tabelle XII.

Kohlendioxyd bei der Citronensäuregärung.

10 Erlenmeyer-Kolben mit seitlich angeschmolzenem Glasrohr wurden beschickt mit je 50 ccm Absud von grünen Bohnen (0,05 % Stickstoff) und 7 % Traubenzucker (je 3,58 g). Die Hälfte der Kolben (Nr. 1 bis 5) blieben ohne Calciumcarbonat, bei den anderen (Nr. 6 bis 10) wurden je 5 g Calciumcarbonat zugesetzt; bei allen wurde fortwährend in möglichst gleichmäßigem Strome Luft durchgeleitet. Zur Aussaat diente C. citrious.

Versuchsdauer	Ohne Calciumcarbonat						Mit Calciumcarbonat					
	Gebildetes Kohlendioxyd in g						Gebildetes Kohlendioxyd in g					
	Nummern der Kolben					Tagesdurchschnitt[1]	Nummern der Kolben					Tagesdurchschnitt[1]
Tage	1	2	3	4	5		6	7	8	9	10	
2	0,13	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—
7	0,80[2])	0,22	0,63	0,36	0,32	0,07	0,40[2])	0,58	0,53	0,48	0,48	0,07
11	1,37[3])	0,78	1,31	0,95	1,02	0,16	0,97[3])	1,22	1,17	1,19	1,14	0,16
15	—	1,31	1,85	1,49	1,53	0,12	—	1,68	1,66	1,68	1,71	0,13
19	—	—	2,33	1,94	1,96	0,13	—	—	2,11	2,09	2,17	0,11
23	—	—	—	2,34	2,32	0,06	—	—	—	2,40	2,57	0,09
29	—	—	—	—	2,98	0,11	—	—	—	—	3,15	0,11

Mit denselben Citromycetenkulturen, deren Kohlendioxydentwicklung soeben besprochen wurde, sind auch Bestimmungen des Mycelgewichtes, der gebildeten Citronensäure und des verbrauchten Zuckers ausgeführt worden. Die Resultate finden sich in Tabelle XIII zusammengestellt. Die ersten Spalten enthalten wieder die Versuche ohne, die letzten jene mit Kreidezusatz. Der Verlauf der Versuche war im allgemeinen ein regelmäßiger. Kleine Unterschiede zwischen den Kolben treten auch hier insbesondere bei Abwesenheit von Calciumcarbonat hervor; so war z. B. das Wachstum in dem nach 9 Tagen verarbeiteten Kolben ohne Kreidezusatz ein außergewöhnlich gutes.

Mit Hilfe der drei Daten: gebildete Citronensäure, entwickeltes Kohlendioxyd und verbrauchter Zucker läßt sich nun feststellen, wie sich die zwei erstgenannten Produkte auf den verschwundenen Zucker verteilen. In beiden Reihen sind in je zwei Spalten die Prozentzahlen angegeben, welche vom verbrauchten Zucker auf Citronensäure und auf Kohlendioxyd treffen;

[1]) Berechnet auf den Zeitraum seit der vorhergehenden Wägung.
[2]) Diese Wägung fand schon am 6. Tage statt.
[3]) Diese Wägung fand schon am 9. Tage statt.

der Rest des Zuckers ist dann zur Mycelbildung verwendet worden. Für Citronensäure lassen sich diese Zahlen aus der gebildeten Menge dieser Substanz direkt berechnen unter der Annahme, daß ein Molekül Citronensäure einem Moleküle Glucose entspricht, wie die im allgemeinen Teil angeführte Gleichung I zeigt. Endlich läßt sich dieselbe Zahl für Kohlendioxyd ableiten aus der Menge des entwickelten Kohlendioxyds unter der Voraussetzung, daß nach der ebenfalls oben schon gegebenen Gleichung II 1 Molekül Traubenzucker 6 Moleküle Kohlendioxyd liefern kann. Etwas komplizierter wird die letzterwähnte Berechnung für die Versuche mit Kreidezusatz. Bei diesen muß von der Menge des entwickelten Kohlendioxyds zunächst die Menge dieses Gases abgezogen werden, welche aus dem Calciumcarbonat herstammt. Nun ist aber nicht alle gebildete Citronensäure schließlich als Calciumsalz vorhanden, sondern ein Teil derselben an andere in der Nährlösung vorhandene Basen gebunden. Die Zahlen würden deshalb unrichtig werden, wenn man einfach das der gebildeten Citronensäure äquivalente Kohlendioxyd in Abzug bringen wollte. Wir haben deshalb unter der Annahme, daß bei den Versuchen ohne und mit Kreide die gleiche Menge Citronensäure an Bestandteile der Nährlösung gebunden sei, festgestellt, welcher Anteil der gebildeten Citronensäure in freiem Zustande, welcher Anteil in Salzform vorhanden ist. Die bei den Versuchen ohne Kreide in Salzform vorhandene Citronensäure wurde nun bei den Versuchen mit Calciumcarbonat von der Gesamtmenge der gebildeten Citronensäure in Abzug gebracht und diejenige Menge Kohlendioxyd, welche dem dann hinterbleibenden Rest von Citronensäure äquivalent ist, subtrahiert von der Menge des direkt entwickelten. Die weder zur Citronensäure- noch zur Kohlendioxydbildung verbrauchten Prozente des Zuckers haben zur Bildung des Mycels gedient.

Vergleicht man nun die drei Spalten, welche über diese Prozentzahlen Auskunft geben, so zeigt sich zunächst für die Versuche mit Kreidezusatz, daß der Anteil des Zuckers, der in Kohlendioxyd übergeht, während der Versuchsdauer ziemlich konstant bleibt, die Menge, welche in Citronensäure übergeführt wird, im großen ganzen ansteigt, wogegen die auf Zunahme des Mycelgewichtes treffende Zuckermenge fortwährend deutlich ab-

nimmt. Im Verlaufe der Zeit scheint demnach die Neubildung von Mycel teilweise dadurch ausgeglichen zu werden, daß vorhandenes veratmet oder in Citronensäure übergeführt wird. Vielleicht sind diese Vorgänge noch durch die starke Abnahme des Zuckers in der Nährlösung, von dem nach 29 Tagen nurmehr 0,4 °/₀ in der Flüssigkeit vorhanden waren, befördert worden.

Was die Versuche ohne Kreidezusatz betrifft, so nimmt hier die Menge des Zuckers, welcher als Kohlendioxyd wiedererscheint, einen beträchtlich größeren Umfang an und steigert sich fortwährend. Der Teil des Zuckers, welcher zur Bildung von Mycel dient, nimmt langsamer ab als bei den Versuchen mit Kreide. Die Menge des Zuckers, welche endlich zur Citronensäureerzeugung in Betracht kommt, bleibt lange konstant und nimmt schließlich eher ab. Sie bleibt dauernd beträchtlich unter der gleichen Zahl bei Gegenwart von Calciumcarbonat.[1]

Einige ähnlich durchgeführte Versuche mit Zuckerlösung unter Zusatz von Nährsalzen und nur anorganischem Stickstoff in Form von Ammoniumnitrat sind in der Tabelle XIV wiedergegeben. Ohne und mit Calciumcarbonatzusatz fanden dabei wieder dieselben Bestimmungen und Berechnungen statt wie in den eben erörterten Versuchen. Infolge des reichlicheren Zuckergehaltes der Nährlösung, der 14,5 °/₀ betrug, kam es zu einer reichlicheren Mycelbildung. Sowohl ohne als mit Kreidezusatz fanden sich nach 3 Wochen noch 28 bzw. 29 °/₀ des verbrauchten Zuckers als Mycel wieder. Das sagt also aus, daß die Menge Traubenzucker, welche in Citronensäure plus Kohlendioxyd zusammen überging, annähernd die gleiche war, ohne oder mit Calciumcarbonatzusatz, d. h. der Teil des Zuckers, welcher bei Calciumcarbonatgegenwart als Citronensäure angehäuft wird, erscheint eben bei Abwesenheit von Kreide als Vermehrung des Kohlendioxyds.

---

[1]) Analoge Ergebnisse lieferten noch eine Reihe anderer Versuche, welche in der genannten Dissertation Seite 44 und 45 aufgeführt sind.

Tabelle XIII.
Verteilung des verbrauchten Zuckers auf Citronensäure, Kohlendioxyd und Mycelgewicht.

Die 10 Kolben der Tabelle XII wurden der Reihe nach nach 9 bzw. 15 usw. Tagen verarbeitet und außer dem Kohlendioxyd das Mycelgewicht, die gebildete Citronensäure und der verbrauchte Zucker bestimmt.

Versuchsdauer	Ohne Calciumcarbonat							Mit Calciumcarbonat						
	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Verbrauchter Traubenzucker	Entwickeltes Kohlendioxyd [1]	Vom verbrauchten Zucker treffen Prozente auf: Citronensäure	Kohlendioxyd [2]	Mycelgew. [3]	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Verbrauchter Traubenzucker	Entwickeltes Kohlendioxyd [1]	Vom verbrauchten Zucker treffen Prozente auf: Citronensäure	Kohlendioxyd [2]	Mycelgew. [3]
Tage	g	g	g	g	%	%	%	g	g	g	g	%	%	%
9	0,62	0,18	1,48	1,37	11	63	26	0,45	0,20	1,17	0,97	15	54	31
15	0,56	0,20	1,36	1,28	12	62	26	0,47	0,67	2,04	1,68	28	48	23
19	0,71	0,37	2,36	2,33	13	64	23	0,64	0,93	2,45	2,11	33	52	15
23	0,71	0,32	2,29	2,34	12	69	19	0,67	0,84	2,52	2,40	29	58	12
29	0,83	0,25	2,66	2,98	8	77	15	0,79	1,20	3,15	3,15	33	62	5

Citronensäurebildung im luftleeren Raum.

Nach **Mazé** und **Perrier** vermag gut entwickeltes Pilzmycel auch im luftleeren Raume Citronensäure zu liefern, indem es selbst zerfällt. Wir haben über diese interessante Beobachtung eine Anzahl von Versuchen angestellt, von welchen einige negativ verlaufen sind. Auch die französischen Forscher berichten, daß diese Versuche nicht immer gelingen. Die beste von unseren Versuchsreihen[4] sei in folgendem beschrieben (Tabelle XI). Die Mycelien zerfielen dabei im luftverdünnten Raum unter Verlust von durchschnittlich 40% ihres Gewichts; außer Citronensäure konnte das Auftreten von Kohlendioxyd, ferner von geringen Mengen von Äthylalkohol, nachgewiesen

[1]) Umfaßt sowohl die Atmungskohlensäure als (bei den Versuchen mit Kreide) das aus dieser durch die gebildete Citronensäure in Freiheit gesetzte Kohlendioxyd.

[2]) Das aus dem Calciumcarbonat durch die entstehende Citronensäure ausgetriebene Kohlendioxyd ist hier bereits in Abzug gebracht, so daß sich die Zahlen nur auf das aus dem Zucker direkt oder aus vorher gebildeter Citronensäure entstehende Kohlendioxyd beziehen.

[3]) Diese Zahl ergibt sich als Restbetrag des verbrauchten Zuckers.

[4]) Siehe H. **Wüstenfeld**, Dissertation, Berlin 1908, S. 57 ff.

durch die Jodoformreaktion, und von etwas Essigsäure, die mit Wasserdampf übergetrieben wurde, beobachtet werden. Die Bildung der letzteren beiden Stoffe wird auch von Mazé und Perrier erwähnt.

Tabelle XIV.

Verteilung des verbrauchten Zuckers auf Citronensäure, Kohlendioxyd und Mycelgewicht bei anorganischer Stickstoffquelle.

Je 50 ccm anorganischer Nährlösung, hergestellt aus dem Glührückstand des Absuds von weißen Bohnen, welcher 0,09 % des Absuds beträgt, und Auffüllen auf das ursprüngliche Volumen, unter Zusatz von Ammoniumnitrat, so daß die Lösung 0,05 % Stickstoff aufweist, und von 14,50 % Traubenzucker (je 7,25 g). Ohne und mit Zusatz von Calciumcarbonat (5 g); infiziert mit C. citricus.

Versuchsdauer	Ohne Calciumcarbonat							Mit Calciumcarbonat						
	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Verbrauchter Traubenzucker	Entwickeltes Kohlendioxyd[1]	Vom verbrauchten Zucker treffen Prozente auf: Citronensäure	Kohlendioxyd[2]	Mycelgew.[3]	Mycelgewicht	Gebildete Citronensäure	Verbrauchter Traubenzucker	Entwickeltes Kohlendioxyd[1]	Vom verbrauchten Zucker treffen Prozente auf: Citronensäure	Kohlendioxyd[2]	Mycelgew.[3]
Tage	g	g	g	g	%	%	%	g	g	g	g	%	%	%
16	0,70	0,29	2,36	1,47	10	42	48	—	—	—	—	—	—	—
21	0,77	0,35	3,12	2,69	10	61	29	0,76	0,86	2,94	2,15	26	46	28

Zehn starkwandige Filtrierkolben zu 1 Liter Inhalt wurden mit je 220 ccm Absud von weißen Bohnen (0,02 % Stickstoff) und 10 % Traubenzucker ohne Kreidezusatz beschickt, sterilisiert und hernach gleichmäßig mit C. citricus geimpft. Nachdem nach 17 Tagen kräftige Mycelentwicklung stattgefunden hatte, entnahm man von allen Kolben je 100 ccm der Nährlösung unter sterilen Bedingungen und stellte damit den Citronensäure- und Zuckergehalt fest. Dann wurden die Kolben 1 bis 4, nachdem sie mit gutschließenden, durch Kollodium gedichteten

[1]) Umfaßt sowohl die Atmungskohlensäure als das aus dem Calciumcarbonat durch die gebildete Citronensäure in Freiheit gesetzte Kohlendioxyd.

[2]) Das aus dem Calciumcarbonat durch die entstehende Citronensäure ausgetriebene Kohlendioxyd ist hier bereits in Abzug gebracht, so daß sich die Zahlen nur auf das aus dem Zucker direkt entstehende Kohlendioxyd beziehen.

[3]) Diese Zahl ergibt sich als Restbetrag des verbrauchten Zuckers.

Kautschukstopfen, welche Quecksilbermanometer trugen, verschlossen waren, durch das seitliche Absaugrohr mittels der Wasserstrahlpumpe bis zur Druckkonstanz von 10 bis 13 mm evakuiert. Die Kolben 5 bis 7 blieben zur Kontrolle unverändert stehen (nur waren, wie erwähnt, aus jedem 100 ccm der Nährlösung entnommen worden). Von den Kolben 8 bis 10 endlich wurde unter möglichst sterilen Bedingungen das Pilzmycel geerntet und sein Gewicht bestimmt; die Durchschnittszahl dieser drei Versuche, welche nur wenig voneinander abwichen, ist bei den Berechnungen als Mycelgewicht auch der Kolben 1 bis 7 nach 17tägigem Wachstum zugrunde gelegt. Sämtliche Kolben blieben nun weitere 17 Tage stehen. In den Kolben 8 bis 10, bei welchen das Mycel entfernt worden war, bildete sich allmählich eine neue Pilzdecke auf Kosten des in der Lösung noch vorhandenen Zuckers und der von der früheren Ernte zurückgebliebenen Sporen, so daß nach 17 Tagen ein zweites Mal geerntet werden konnte. In den luftleer gepumpten Kolben 1 bis 4 zeigte sich in den ersten Tagen eine kleine Druckzunahme, infolge der durch intramolekulare Atmung entstehenden Kohlensäure; wurde ein evakuiertes Gefäß mit Kalilauge vorgeschaltet, so stellte sich nach einigen Stunden der ursprüngliche Manometerstand wieder her; das gebildete Gas war also Kohlendioxyd. Nach 34 Tagen wurde bei allen zehn Kolben das Mycelgewicht, die vorhandene Citronensäure und der zurückgebliebene Traubenzucker (abermals in je 100 ccm der Lösung) festgestellt. Zur Bestimmung des letzteren Körpers ermittelte man die Reduktionskraft gegenüber Fehlingscher Lösung; es können damit allerdings Fehler verknüpft sein, da es nicht ausgeschlossen ist, daß insbesondere im luftleeren Raum noch andere reduzierende Stoffe auftreten als Zucker.

Die Veränderungen in der Zeit vom 17. bis zum 34. Tag sind in den drei letzten Spalten der Tabelle XV zusammengestellt. In den evakuierten Kolben 1 bis 4 zeigte sich eine sehr erhebliche Abnahme des Mycels, ferner eine allerdings geringe und nicht ganz gleichmäßige Zunahme an Citronensäure, welche aber doch über der Fehlergrenze liegen dürfte; die Änderungen im Zuckergehalt waren nur unbedeutend. In den drei nicht ausgepumpten Kontrollkolben 5 bis 7 fand noch ein starkes Wachstum des Mycels statt, dem eine beträchtliche

Abnahme des Zuckergehaltes entspricht; die Citronensäurebildung war deutlich fortgeschritten, aber nicht sehr stark, wahrscheinlich, weil der Gehalt an dieser Säure in Anbetracht der Abwesenheit von Kreide von vornherein schon ein verhältnismäßig hoher war. In den Kolben 8 bis 10, in welchen das Mycel am 17. Tage entfernt worden war, hatte sich eine neue Pilzdecke gebildet und infolge davon der Zuckergehalt abgenommen. In zwei von diesen Kolben war auch eine erhebliche Citronensäurebildung eingetreten, offenbar begünstigt durch die starke Assimilationstätigkeit und den reichlichen Sauerstoffgenuß dieses jungen und dünnen Mycels.

Tabelle XV.

Citronensäurebildung im luftleeren Raum.

Je 220 ccm Absud von weißen Bohnen (0,02 % Stickstoff, 10 % Traubenzucker) ohne Calciumcarbonat wurden mit C. citricus geimpft. Nach 17 Tagen wurden 4 Filtrierkolben annähernd luftleer gepumpt und am 34. Tage untersucht; 3 weitere Kolben blieben zur Kontrolle unverändert stehen; von 3 Kolben wurde endlich das Mycelium am 17. Tage entfernt und gewogen und die Kolben bis zum 34. Tage stehen gelassen.

	Versuchs-anordnung	Nr. der Kolben	Am 17. Tage vorhanden			Am 34. Tage vorhanden			Veränderg. i. d. Zeit vom 17. bis 34. Tage		
			Mycelgewicht g	Citronensäure %	Traubenzucker %	Mycelgewicht g	Citronensäure %	Traubenzucker %	Mycelgewicht[1] g	Citronensäure %	Traubenzucker %
Ohne Calciumcarbonat	Filtrierkolben am 17. Tage direkt evakuiert mit Manometer	1	—	0,61	8,95	0,84	0,65	8,85	—0,57	+ 0,04	— 0,10
		2	—	0,48	8,60	0,79	0,72	8,65	—0,62	+ 0,24	+ 0,05
		3	—	0,51	8,55	0,91	0,66	8,70	—0,50	+ 0,15	+ 0,15
		4	—	0,53	8,75	0,84	0,64	8,90	—0,57	+ 0,11	+ 0,15
	Filtrierkolben nicht evakuiert (Kontrolle)	5	—	0,61	8,95	2,40	0,74	4,85	+0,99	+ 0,13	— 4,10
		6	—	0,49	8,40	2,28	0,68	4,55	+0,87	+ 0,19	— 3,85
		7	—	0,44	8,55	2,44	0,54	3,95	+1,03	+ 0,10	— 4,60
	Filtrierkolb. nicht evakuiert, Mycelien am 17. Tag entfernt	8	1,38	0,53	8,75	0,12[2])	0,53	8,50	+0,12	± 0	— 0,25
		9	1,29	0,45	9,00	0,26[2])	0,59	8,80	+0,26	+ 0,14	— 0,20
		10	1,56	0,45	8,48	0,14[2])	0,68	8,40	+0,14	+ 0,23	— 0,08

[1]) Als Mycelgewicht vom 17. Tage wurde hier der Durchschnitt der Mycelgewichte der Kolben 8 bis 10 nach eben dieser Zeit zugrunde gelegt.

[2]) Dieses Mycel ist nach Entfernung des innerhalb 17 Tagen gewachsenen zwischen dem 17. und 34. Tage neugebildet worden.

Citromyces-Kulturen auf essig- und oxalsäurehaltigen Nährlösungen.

Wie im allgemeinen Teil schon erwähnt, haben Claisen und Hori darauf hingewiesen, daß die Bildung der Citronensäure in höheren Pflanzen möglicherweise synthetisch aus Essig- und Oxalsäure erfolgt. Da letztere beiden Stoffe unter Umständen wohl auch in Kulturen von Citromyceten auftreten können, wäre möglich, daß diese Säuren auch den Weg bezeichnen, auf welchem die Citronensäurebildung durch jene Schimmelpilze vor sich geht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde versucht, ob kleinere Mengen der freien Säuren oder ihre Salze ohne oder auch bei Zuckerzusatz zur Bildung von wesentlichen Mengen von Citronensäure durch die Citromyceten Anlaß geben.

Je zwei Kölbchen mit Absud von grünen Bohnen (0,03 °/₀ Stickstoff) wurden versetzt mit:

1. 0,125 °/₀ Essigsäure + 0,125 °/₀ Oxalsäure,
2. ebensoviel von den freien Säuren + 1,5 °/₀ Natriumacetat + 1 °/₀ sekundäres Kaliumoxalat,
3. 1,5 °/₀ Natriumacetat + 1 °/₀ sekundäres Kaliumoxalat.

Die Hälfte der Kölbchen wurde ohne Zucker belassen, die andere mit 6 °/₀ davon versehen und sämtliche sterilisiert. Überall wurde C. citricus ausgesät. In der Reihe ohne Zucker wuchsen die Pilze in Kölbchen 1 rasch, aber das Mycel blieb dürftig. Nach 28 Tagen waren beide zugesetzten Säuren qualitativ noch nachweisbar, Citronensäure dagegen nicht aufzufinden. In Kölbchen 2 keimten die Sporen überhaupt nicht[1]. In Kölbchen 3 fand zwar Mycelbildung statt, Citronensäure trat aber auch nach 4 Wochen nicht auf. Ähnlich negativ verlief die zweite Versuchsreihe mit Zuckerzusatz.

Bilden die Citromyceten aus Leucin Fuselöl?

Nach der Annahme von Mazé und Perrier soll die Citronensäure bei einem autolytischen Abbau des Protoplasmas, also wohl aus Eiweißkörpern der Citromyceten, entstehen. Man würde sich demnach etwa vorzustellen haben, daß sie in ähnlicher Weise aus einer Aminosäure hervorgeht, wie nach den Unter-

---

[1]) Nach W. Benecke, Botan. Ztg. 65, Abt. II, 75, 1907 wirken auch für Aspergillus niger Zusätze von Natriumacetat bereits bei Konzentrationen von über 1 °/₀ schädlich.

suchungen von F. Ehrlich der Amylalkohol bei der alkoholischen Gärung durch Hefe aus Leucin gebildet wird. Zur Prüfung, ob ähnliche Fähigkeiten zur Zerlegung von Aminosäuren auch den Citromyceten zukommen, wurden mehrere Kolben mit 100 ccm Absud von weißen Bohnen (0,039 % N) mit 6,5 % Traubenzucker und 0,5 % Leucin versetzt und nach dem Sterilisieren mit C. citricus geimpft. Die Mycelien entwickelten sich üppig; nach einigen Wochen war das Leucin aus der Lösung verschwunden. Beim Abdestillieren der Flüssigkeit fand sich aber kein Fuselöl vor. Die Citromyceten besitzen demnach kein besonderes Vermögen zum Abbau von Aminosäuren. Dieses Resultat spricht nicht zugunsten der Anschauung von Mazé, daß die Citronensäure durch Spaltung von Eiweißkörpern entsteht.

Preßsaft und Dauerpräparate aus C. citricus.

Die Herstellung von Preßsaft aus den Pilzmycelien nach den bei Sproßhefe ausgearbeiteten Methoden bereitet keine Schwierigkeiten. Man erhält z. B. aus 350 g bei 50 Atmosphären abgepreßten Pilzrasen nach dem Zerreiben mit Sand und Kieselgur beim Auspressen 120 ccm braunroten Saft, der neutral reagiert. Die Gegenwart von Invertase, Diastase, Katalase und Tryptase im Preßsaft konnte leicht nachgewiesen werden. Dagegen blieben acht ausführliche Versuchsreihen über Bildung von Citronensäure aus Zucker bei Durchleiten eines Luftstromes ohne deutliches Ergebnis.[1]) Die in einigen Fällen anscheinend entstandene äußerst geringe Menge von Citronensäure dürfte innerhalb der Versuchsfehler liegen.

Da der Preßsaft beim Erhitzen aber nur wenig Gerinnsel abschied und nur schwache Biuretreaktion zeigte, da ferner eine Prüfung ergab, daß nur 12 % des Stickstoffgehaltes des Mycels im Safte sich wieder vorfinden, konnten die negativen Resultate darin begründet sein, daß die wirksamen Substanzen nicht in den Preßsaft übergehen.

Es mußten daher die gleichen Versuche auch noch mit durch Aceton getöteten Dauerpräparaten des C. citricus ausgeführt werden, die ebenfalls nach den bei der Hefe ausprobierten Methoden hergestellt wurden (z. B. lieferten 265 g

[1]) Vier von diesen Reihen sind in der erwähnten Dissertation S. 72 ff. beschrieben.

abgepreßtes Mycel 100 g Acetondauerpräparat) und sich bei einem besonderen Versuch als steril erwiesen. Es wurden sieben ausführliche Versuche[1]), bei welchen solche Präparate mit Zuckerlösung übergossen und unter Luftzuleitung mit und ohne Gegenwart von Kreide mehrere Wochen aufgestellt wurden, durchgeführt. Um auch im Falle, daß einige Sporen die Acetonbehandlung überlebt haben sollten, gesichert zu sein, wurde bei allen Versuchen Toluol und bei einigen außerdem noch Thymol zugesetzt, was die Auskeimung der Sporen verhindert. Eine Zunahme an Citronensäure, welche von vornherein in den Dauerpräparaten schon in geringer Menge vorhanden war und deren Bestimmung in dem dicken Pilzbrei auf gewisse Schwierigkeiten stößt, konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, wenngleich einige Versuche kleine positive Zahlen ergaben, die aber innerhalb der Fehlergrenzen liegen. Dagegen zeigten sich die schon bei Besprechung des Preßsaftes erwähnten Enzymwirkungen.

Untersuchung des Acetons, welches zur Herstellung der Dauerpräparate gedient hatte.

Destilliert man die Hauptmenge des Acetons bei niederem Drucke ab und läßt den Rest freiwillig an der Luft verdunsten, so bleibt eine braune Flüssigkeit zurück. Durch wiederholtes Ausschütteln derselben mit Äther erhält man eine ätherische Lösung neben einer wässerigen, in Äther unlöslichen Schicht. Die letztere wird auf dem Wasserbad zum Sirup eingedampft und erstarrt dann in der Kälte zu einem Krystallbrei. Die Krystalle, auf Ton von der Mutterlauge befreit, lassen sich durch zweimaliges Umkrystallisieren aus mit ein viertel Volum Wasser versetztem heißem Aceton leicht reinigen. Man erhält rein weiße, nadelförmige Krystalle, die frei von Stickstoff und von Asche sind, sich in Wasser leicht auflösen, ohne auf Lakmuspapier zu reagieren und süßlich bitteren Geschmack besitzen. Die Lage des Schmelzpunktes: 165 bis 166° und die Elementaranalyse beweisen, daß es sich um Mannit handelt.

0,1549 g Substanz gaben 0,2247 g CO_2 und 0,1082 g H_2O.

Ber. für $C_6H_{14}O_6$	Gef.
C 39,53%	39,56%
H 7,76%	7,83%

[1]) Drei von diesen Versuchsreihen sind am a. a. O. S. 77 ff. zu finden.

Zur weiteren Identifizierung haben wir uns noch überzeugt, daß die Substanz weder vor, noch nach dem Kochen mit verdünnter Schwefelsäure und Übersättigen mit Alkali Fehlingsche Lösung reduziert, wohl aber nach vorsichtiger Oxydation mit Chromsäure (Reaktion von Wefers-Bettinck[1]). Um zu entscheiden, welches optische Isomere vorliegt, wurde die etwa 1 % ige Lösung, die für sich keine merkbare Ablenkung der Polarisationsebene erzeugte, mit Borax versetzt[2]), worauf deutliche Rechtsdrehung zu beobachten war. Es handelt sich also auch hier um d-Mannit, nach Czapek die einzige natürlich vorkommende Modifikation.

Die von der wässerigen, mannithaltigen Schicht abgetrennte ätherische Lösung hinterläßt, mit Wasser noch mehrmals gewaschen und mit Pottasche getrocknet, beim Verjagen des Lösungsmittels ein braunes Öl, das der Hauptsache nach aus Fetten besteht. Es wird durch Kochen mit Natronlauge unter Zusatz von Alkohol verseift; das erhaltene Produkt löst sich dann leicht in Wasser und gibt mit Salzsäure eine starke halbfeste Fällung, welche die in Freiheit gesetzten Fettsäuren repräsentiert. Wird das Filtrat von letzteren eingedampft und schließlich mit festem saurem Kaliumsulfat erhitzt, so tritt Akroleingeruch auf und das Destillat rötet entfärbte Fuchsin-Schwefligesäure-Lösung, wodurch die Anwesenheit von Glycerin bewiesen ist. In der ätherischen Lösung sind demnach Fette enthalten, welche aus dem Pilzmycel durch das Aceton ausgezogen wurden.

In einer anderen Partie des Acetons gelang es auf folgendem Wege, einen dem Cholesterin nahestehenden Körper nachzuweisen. Versetzt man das Aceton direkt mit ein drittel Volum Wasser, so tritt eine starke weißliche Trübung auf, die bald den Charakter eines abfiltrierbaren Niederschlags annimmt. Die Lösung desselben in Aceton liefert bei freiwilligem Verdunsten büschelförmig gruppierte Krystallblättchen, die auf Tonteller getrocknet einen seidenartigen Glanz zeigen und in Äther löslich sind. Die geringe Ausbeute verhinderte eine vollständige Reinigung. Da aber die Chloroformlösung der Substanz einerseits mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure erhitzt erst Rot-, dann Blau- und schließlich Grünfärbung zeigte (Reaktion von Liebermann-Burchard), andererseits mit konzentrierter Schwefelsäure allein nur Rotfärbung der Schwefelsäure, aber nicht des Chloroforms gab, wie Cholesterin (Reaktion von Salkowski), dürfte höchstwahrscheinlich Isocholesterin vorgelegen haben.

---

[1]) Chem. Centralbl. 1901, II, 1320.

[2]) Vgl. z. B. E. Fischer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 23, 385, 1890.

Über die chemische Durchlässigkeit lebender Algen- und Protozoenzellen für anorganische Salze und die spezifische Wirkung letzterer.

Von

Margherita Traube Mengarini und A. Scala.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Rom.)

(Eingegangen am 2. Januar und 11. April 1909.)

In einer unserer Arbeiten: „Über die Wirkung des Kochsalzes auf Opalina"[1]), klärten wir die Ursache der schädlichen Wirkung isotonischer Kochsalzlösungen auf die obengenannten Protozoen auf.

Zu gleicher Zeit gelang es uns, die Unzulässigkeit einer Verallgemeinerung der Loebschen Hypothese bezüglich der Art nachzuweisen, wie die schädliche Wirkung des Kochsalzes auf gewisse Fische und deren Embryonen ausgeglichen wird. Loeb hat in der Tat nachgewiesen, daß ein junger Fundulus, welcher in einer $^{5}/_{8}$ n-Kochsalzlösung nicht ganz 12 Stunden lebte, mehr als 10 Tage in einem Gemisch von 60 ccm $^{5}/_{8}$ NaCl, 2 ccm $^{10}/_{8}$ n-Calciumchlorid, 2 ccm $^{5}/_{8}$ n-Kaliumchlorid lebte. Loeb hatte auch beobachtet, daß die befruchteten Funduluseier sich in einer $^{5}/_{8}$ n-Kochsalzlösung nicht entwickelten, während sie sich in derselben Lösung nach Zusatz eines der folgenden Salze entwickelten: Calciumsulfat, Bariumsulfat, Bariumchlorid, Magnesiumchlorid, Strontiumchlorid, Calciumnitrat. Er erklärte dies Verhalten mit der Annahme, daß die schädliche Wirkung des Natriumchlorides von all den Kationen ausgeglichen wurde, die eine dem Calciumatom gleichnamige elektrische Ladung besäßen, natürlich unter Ausschluß derjenigen Metalle, welche

[1]) Archivio di fisiologia 4, 605, 1907.

überhaupt eine Giftwirkung besitzen. Nach unseren Beobachtungen konnte jedoch die Entgiftung des Natriumchlorids auch durch Zusatz von geringen Mengen von kohlensaurem Natron erzielt werden; also mit demselben Kation des schädlichen Salzes, oder aber durch kohlensaures Kalium und natürlich auch durch kohlensaures Calcium.

Wir schlossen daraus, daß die schädliche Wirkung des Natriumchlorids doppelter Natur sei und deshalb zweier Korrekturen bedürfe: durch zweiwertige Kationen in einem Falle, wie durch Calcium, im anderen durch kohlensaure Alkalien und Erden.

Dadurch kamen wir auf die Vermutung, daß das Natriumchlorid im Opalinenkörper ein saueres Milieu hervorbrächte, welches die Opalinen stark schädigte und in schwachen Lösungen durch verschiedene Alkalien neutralisiert würde.

Die Bildung des sauren Mediums im Inneren erklärt sich, wenn wir annehmen, daß das NaCl in Berührung mit den Eiweißkörpern des Protoplasmas sich nicht nur mit ihnen mischte, sondern sich anlagert, und zwar an Gruppen wie Aminoreste. Wir heben diesen Punkt besonders hervor, um die Umbeständigkeit solcher Verbindungen und ihre Wichtigkeit für das Leben zu erklären, welche gewiß nicht klein und noch nicht klar erkannt ist.

Deshalb muß die Verbindung durch folgendes Schema ausgedrückt werden:

$$<\begin{matrix}NH_2\\NH_2\end{matrix} + \begin{matrix}Cl\\Na\end{matrix} \rightarrow <\begin{matrix}NH_2ClH\\NHNa\end{matrix},$$

welches als Resultat die Bildung eines salzsauren Natriumproteids ergibt, das durch Einwirkung eines kohlensauren Alkalis oder Erdalkalis oder eines Hydroxydes sich in ein neutrales Natriumproteid verwandelt, welches den Funktionen des Protoplasmas angemessener ist:

$$2<\begin{matrix}NH_2ClH\\NHNa\end{matrix} + CO<\begin{matrix}ONa\\ONa\end{matrix} \rightarrow 2<\begin{matrix}NH_2\\NHNa\end{matrix} + 2\,NaCl + CO<\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix}$$

$$<\begin{matrix}NH_2ClH\\NHNa\end{matrix} + NaOH \rightarrow <\begin{matrix}NH_2\\NHNa\end{matrix} + NaCl + H_2O.$$

Unsere Hypothese, die als Ausgangspunkt eine von uns allein beobachtete Tatsache bei den biochemischen Prozessen im

Opalinenkörper hatte, wird durch die Experimente von Lombardi und Bonamartini gestützt.[1])

Diese Autoren behandeln Eiweißlösungen verschiedener Konzentration mit Lösungen von Kupfersulfat verschiedener Konzentration, erhalten eine Verbindung konstanter Zusammensetzung von ca. 1%iger Löslichkeit, welche 5,06% Kupfer enthält und 8,17% SO_4, so daß diese Verbindung Cu und SO_4 ungefähr in demselben Verhältnis enthält wie das Sulfat. Es handelt sich also um eine Molekular- oder Adsorptionsverbindung, welche man besser und richtiger eine saure Verbindung nennen könnte und welche durchaus unserer ersten Kochsalzverbindung entspricht.

Wenn jedoch der Eiweißlösung genug Kupfersulfat, um die größte Niederschlagsmenge zu erzielen, und dann so viel Natriumhydratlösung zugesetzt wird, bis die Lösung für Lackmuspapier neutral wird, erhält man einen reichlichen, absolut unlöslichen Niederschlag, welcher eine vier- oder fünfmal größere Menge Kupfer enthält als die in der sauren Verbindung, und eine ungefähr siebenmal kleinere Menge SO_4 als die, welche in einer molekularen Verbindung enthalten sein müßte; und das entspricht unserer zweiten Verbindung.

Außerdem bewies einer von uns[2]) 1903 in einer Arbeit über Labferment, daß, wenn der wässerige Extrakt des Magens mit Quecksilberchlorid gefällt und gegen Lackmuspapier mit Bariumhydrat neutralisiert wird, man einen reichlicheren Niederschlag erhält als wenn nicht neutralisiert wird. In dem fast die Gesamtmenge des Enzyms enthaltenden Niederschlag, welches selbst durch fortgesetztes Auswaschen nicht ausgeschieden wird, sind Quecksilber und Chlor in folgenden Proportionen vorhanden:

Cl %	Hg %	Hg entsprechend dem Cl um $HgCl_2$ zu bilden	Hg im Überschuß
1,19	26,09	3,35	22,64
4,00	19,72	11,27	8,45
1,32	23,83	3,72	20,11
0,66	20,92	1,86	19,06

Das heißt also, daß man auch in diesem Falle zwei Verbindungen erhält, von denen die eine sauer und ziemlich löslich

[1]) Rendiconti Soc. Chimica di Roma 1907, 183. — Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 165.

[2]) A. Scala, Stazioni agrarie sperim. ital. 36, 941, 1903.

ist und die andere neutral. In dieser letzteren ist das Quecksilber nicht als $HgCl_2$ vorhanden, sondern es vertritt die Wasserstoffatome in den Seitengruppen, die jedenfalls Amidogruppen angehören.[1])

Daraus geht unzweifelhaft die Neigung der basischen Eiweißkörper hervor, mit den Salzen der Schwermetalle zweierlei Verbindungen einzugehen; eine saure und eine neutrale, die eine anscheinend durch Adsorption, die andere zweifellos durch Substitution; die eine ziemlich löslich, die andere völlig unlöslich.

Da über die Bildung dieser Verbindungen keine Zweifel bestehen können, da sie mehr oder weniger unlöslich und also nachweisbar sind, so kann der Analogie wegen angenommen werden, daß sich dieselben Verbindungen mit Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calciumsalzen usw. bilden, obgleich diese nicht abtrennbar und also nur indirekt nachweisbar sind.

Der von uns erbrachte biologische Beweis ist die beste Bestätigung unserer Annahme, welche auch durch bekannte Tatsachen auf chemischem Gebiete gestützt wird, für welche bis jetzt die Erklärung ungenügend war oder überhaupt fehlte. So kennt man den Mechanismus der Lösung von gewissen unlöslichen Eiweißkörpern und der Fällung anderer löslicher durch gewisse neutrale Mineralsalze nicht, und wir wissen ebenfalls nicht, durch welchen Mechanismus gewisse neutrale Salze in geringen Mengen die physikalischen Eigenschaften der Eiweißkörper ändern. Deshalb gewinnt die Hypothese einer Verbindung, welche neue chemische Individualitäten mit neuen Eigenschaften zur Folge hat, eine fast absolute Sicherheit und gewährt uns die Möglichkeit, in befriedigender Weise Tatsachen der Tier- und Pflanzenphysiologie zu erklären, welche bisher ihrer Dunkelheit wegen vernachlässigt wurden.

Permeabilität.

Damit jedoch diese Verbindungen sich bilden können, müssen wir annehmen, daß die Salze in die Zellen ein- und austreten, was ja der zahlreichen Beobachtungen wegen niemand leugnen wird. So z. B. sah de Vries[2]) nach Behandlung der Zucker-

---

[1]) A. Scala, Stazioni agrarie sperim. ital. 40, 129, 1907.

[2]) Archiv. néerl. des sciences exactes et natur. 6, 115, 1871.

rübenzelle mit Ammoniak, daß der Farbstoff im Zellinnern dunkel wurde, ohne daß die Zelle anscheinend angegriffen wurde.

Pfeffer[1]) bewies dann, daß verdünnte Mineralsäuren in die Zellen eindringen, in denen analoge Veränderungen mit denen von de Vries beobachteten auftreten. Er zeigte dann auch, daß gewisse Anilinfarben in die lebende Zelle eindringen und vom Protoplasma gespeichert werden[2]), sowie die entgegengesetzte Eigenschaft des Wasserstoffsuperoxyds und der Citronensäure, gefärbte Zellen zu entfärben.

Janse[3]) bewies das Eindringen von Kaliumnitrat in das Innere der Zellen von Tradescantia discolor und Curcuma rubricaulis vermittelst Diphenylaminsulfats, während Wieler[4]) das gleiche für Pflänzchen von Phaseolus vulgaris bewiesen hatte, welche er auf einem dieses Salz enthaltenden Nährboden züchtete.

Andererseits hat die aus den isotonischen Werten berechnete Menge vieler Plasmolyse erzeugender Körper schließlich nicht der Voraussicht entsprochen, da sie entweder gar keine Plasmolyse erzeugten, oder nur, wenn sie in sehr viel größeren Mengen verwandt wurden.

So entplasmolysiert nach Klebs[5]) Glycerin die Zygnemazellen und nach de Vries[6]) Urea Spirogyra und andere Pflanzenzellen.

Es ist daher der Eintritt dieser und vieler anderen von Hanstein[7]) und Overton[8]) studierten Körper sicher, unter denen Asparagin, Mineralsäuren, organische und Aminosäuren, Amide, Alkohole, mono-, di- und trisubstituierte Kohlenwasserstoffe, Haloidderivate, Nitroalkohole, Ester, Anilin, Chloroform, Aldehyde, Ketone, Aldoxime, Ketoxime, Alkaloide. Der Eintritt der letzteren in die Zellen wurde zuerst von Loew und Bokorny[9]) unter der Form von „Proteosomen" nachgewiesen.

---

[1]) Osmotische Untersuchungen, Leipzig 1877, 135.

[2]) Untersuchungen a. d. botan. Institut Tübingen 1886, 179.

[3]) Versaml. en meded. d. koninkl. Akad. van wetensch. Amsterdam 4, 332, 1888.

[4]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 5, 375, 1887.

[5]) Untersuchungen a. d. botan. Institut zu Tübingen 2, 489, 1888.

[6]) Botan. Zeitschr. 1888. — Über den isotonischen Koeffizient des Glycerins.

[7]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1896.

[8]) Vierteljahrsschr. d. Naturf.-Ges. in Zürich 1895.

[9]) Biolog. Centralbl. 11, 5, 1891.

Rysselberghe[1]) hat durch chemische Reaktionen nachgewiesen, daß in die Zellen von Tradescantia Natrium- und Kaliumchlorid sowie Kaliumsulfat mit außerordentlicher Geschwindigkeit eindringen. Er hat auch nachgewiesen, daß das Natriumchlorid als solches in die Zelle dringt, ein Nachweis, der schon von Storp[2]) geliefert wurde, welcher in der Asche von Pflanzen, die in 0,8 %igen Lösungen dieses Salzes kultiviert wurden, 6,31 % Chlor mehr fand als in der Asche von Pflanzen, welche in destilliertem Wasser gezüchtet wurden; im ganzen also 10,83 % Chlor und 8,94 % Natriumoxyd, d. h. in einem Verhältnis, um fast ganz genau NaCl zu bilden.

Ein ähnlicher Beweis ist von Stange[3]) geliefert worden, welcher die Salze der Nährflüssigkeit in den Stengeln der darin gezüchteten Pflanzen wiederfand. Er fand, daß die Menge der absorbierten Salze mit der Konzentration der Nährflüssigkeit zunahm. Trotzdem war es Rysselberghe nicht möglich, die in den Nährflüssigkeiten enthaltenen Saccharose und Glucose in den Zellen wieder zu finden, obgleich der Eintritt der Monosaccharide in lebende Zellen nachgewiesen ist, woselbst sie Reservekörper wie Di- und Polysaccharide bilden.

Aber der Eintritt letzterer in die Zellen wird wahrscheinlich durch Umwandlung der Mono- und Disaccharide in einfachere Verbindungen bewerkstelligt, welche die Plasmamembran durchdringen, um sich dann zurückzuverwandeln und noch höhere Verbindungen vermittelst der Enzyme einzugehen, welche im Innern jeder Zelle vorhanden sein müssen.

Schließlich hat Beneke[4]) feststellen können, im Gegensatz zu Loew, daß Spirogyra nach einem 24stündigen Aufenthalt in folgenden drei Lösungen stirbt: 0,5 %igem Kaliumnitrat, zweibasischem Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat, und daß die Störungen zuerst in der Magnesiumsulfat-, dann in der Phosphat- und schließlich in der Nitratlösung auftreten.

Der Zellinhalt in Magnesiumsalzlösungen getauchter Algen

---

[1]) Réaction osmotique des cellules végétales à la concentration du milieu, Bruxelles 1899.

[2]) Über den Einfluß von Chlornatrium auf die Keimung einheim. Kulturgew., Berlin 1883.

[3]) Zitiert nach Rysseberghe, l. c. 72.

[4]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1907, 322.

quillt stark auf, sehr viel mehr als in anderen Lösungen, besonders als in kalkhaltigen. Beneke hat außerdem gefunden, daß auch die Anionen eine Wirkung auf die Algen haben und daß das Ion Cl′ weniger schädlich als das Ion SO''_4 und das Ion NO'_3 und PO'''_4 ist.

All dies beweist, daß die genannten Salze in das Zellplasma eindringen und dort spezifisch wirken. Klebs[1]) hat gezeigt, daß die plasmolysierenden Kaliumnitrat- und Natriumchloridlösungen nicht nur wasserentziehend wirken, und daß das Protoplasma von Vaucheria in schwachen Kaliumnitrat- und Natriumchloridlösungen mehr leidet als im destillierten Wasser. Und True[2]) bemerkt ausdrücklich, daß die obengenannten Salzlösungen nicht des veränderten Druckes wegen schaden, sondern wahrscheinlich ihrer spezifischen Wirkung halber, und daß für Spirogyra Kaliumnitrat schädlicher als Natriumchlorid sei.

Das Eindringen der Salze in Tierzellen ist lange Zeit nur indirekt bewiesen worden, und die betreffenden Arbeiten stammen teils aus dem Gebiet der Dermatologie, teils der Pharmakologie. Hofmeister[3]) ist der erste, welcher die Wirkung der Salze auf die Kolloide untersuchte und annahm, daß die Fällung der Eiweißkörper ihren Ursprung in der durch die gelösten Salze bewirkten Wasserentziehung hat und daß die physiologische Wirkung der Salze in Beziehung zu dem Diffusionsgrade steht.

Die schwer diffundierenden Salze wie die Sulfate, die Tartrate und die Phosphate wirken abführend, die leicht diffundierenden Chloride, Bromide, Jodide, Nitrate usw. wirken diuretisch. Zwischen beiden Gruppen steht eine gewisse Anzahl indifferenter Salze.

Später jedoch wurde nachgewiesen, daß diese Wirkungen besser durch die chemisch-physikalischen Eigenschaften und physiologischen Beziehungen zwischen Eiweißkörpern und freien Salzionen zu erklären sind. So bemerkt Hardy[4]), daß Lösung oder Fällung der Kolloide von der Valenz der Ionen abhängt, da geringe Mengen von zweiwertigen Ionen und noch geringere von dreiwertigen genügen, um gewisse Kolloide und unter diesen

---

[1]) Zit. n. Beneke, l. c.

[2]) Zit. n. Beneke, l. c.

[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak. 24, 25, 27, 28, 1887—1891.

[4]) Journ. of Physiol. 24, 1899.

die Eiweißkörper aus mit einwertigen Anionen und Kationen hergestellten Lösungen zu fällen. Da die Funktionen des Protoplasmas von einer bestimmten physikalischen Qualität desselben abhängen und das Protoplasma selbst hauptsächlich aus Kolloiden besteht, so haben alle Veränderungen des Kolloidalzustandes eine funktionelle Veränderung zur unmittelbaren Folge. Diese hängt nun ihrerseits nach Hardy und Pauly[1]) von Veränderungen der Zahl der Ionen ab. Damit würde also die Fällung der Eiweißkörper nicht von der Wirkung der Salzmoleküle abhängen, sondern von der Wirkung der einzelnen Ionen, und zwar so, daß die Kationen die Eiweißkörper fällen und die Anionen sie lösen.

Außerdem gibt es Untersuchungen von Hamburger und Köppe über die Wirkung der Salze auf die roten Blutkörperchen, von Ringer[2]) über die Reizbarkeit der Muskeln durch Natriumchlorid allein und Mischungen mit Kalium- und Calciumsalzen; von Locke[3]) und von Grützner[4]) über die indirekte Reizbarkeit von Muskeln und Nerven durch NaCl allein und durch ein Gemisch mit Calciumsalzen; von Loeb in zahlreichen Arbeiten vom Jahre 1897 bis 1901 über die schädliche Wirkung von Natriumchlorid auf die Eier von Fundulus, auf Fundulus, auf den Gastrocnemius des Frosches und auf andere Muskeln[5]); von Overton[6]) und unabhängig von ihm, von H. Meyer[7]) über die Narcotica, welche mit großer Schnelligkeit vermittelst der Fettkörper in die Gehirnganglien gelangen, an denen letztere reich sind. Die Narcotica verändern die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas, welches quillt. Dann hinge also die Narkose nicht von chemischen Vorgängen ab, sondern von osmotischen Prozessen zwischen den Narcotica und den Lipoidkörpern des Gehirns, welche zu ersteren mechanische Affinitäten besitzen.

Außerdem hat Overton bewiesen, daß das zentrale und

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2 u. 3.

[2]) Journ. of Physiol. 4, 7, 8, 1883, 1886, 1895.

[3]) Journ. of Physiol. 8, 318, 1895.

[4]) Pflügers Archiv f. Physiol. 92, 1902.

[5]) Pflügers Archiv, 69, 1, 1897; 71, 457, 1898. — Festschrift für Prof. Fick, 1899, 101. — Amer. Journ. of Physiol. 3, 327, 383, 1900; 5, 362, 1901.

[6]) Studien über die Narkose, Jena 1901.

[7]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42, 1899; 46, 1901.

das peripherische Nervensystem nach und nach ihre Reizbarkeit in einem Nichtelektrolyten, z. B. Zuckerlösung, obgleich langsamer als die Muskeln, verlieren, und daß die Reizbarkeit wiederkehrt, sowie die Nerven und Muskeln in eine Natriumchloridlösung gebracht werden. Deshalb ist für die Tätigkeit des Zentralnervensystems mindestens eine 0,1 %ige Lösung dieses Salzes nötig.[1]) So „hängen also die Phänomene der Muskelkontraktionen und der Nervenleitung von physikalisch-chemischen Prozessen ab. Die elektromotorischen Phänomene des Tierkörpers müssen wir jetzt durch die Permeabilität der lebenden Membranen für bestimmte Ionen erklären, welche sich in einer wässerigen Lösung bilden, beladen mit einer mehr oder weniger großen Elektrizitätsmenge". Nach Nernst bezieht sich jede Nervenreizung auf eine Verlagerung von Ionen durch einen elektrischen Strom.[2])

Auch Enriques[3]) hat bewiesen, daß das Natriumchlorid durch die Plasmahaut der Protozoen und der Limnaea geht, obgleich er der Meinung ist, daß der Eintritt durch Absorption und nicht durch Osmose bewirkt wird. Auf diese Weise erklärt er auch die Experimente von Jasuda mit Ciliaten und Flagellaten, welche sich an isotonische Lösungen verschiedener Körper in verschiedenem Grade anpassen. Denn „wenn die Salze nicht in das Innere des Infusors oder des Flagellaten eindrängen, wäre es unverständlich, wie isotonische Lösungen verschiedener Körper verschieden auf das Leben dieser Protozoen wirken könnten. Das muß alle vorsichtig machen, die schädliche Wirkung eines Salzes in anisotonischer Lösung nur dem Druckunterschiede und nicht, und zwar oft in größerem Maße, seiner chemischen Wirkung auf das Protoplasma zuzuschreiben".

Außerdem fand De Blasi,[4]) daß die roten Blutkörperchen des Hundes sich in isotonischen Zucker- oder Natriumchloridlösungen auflösen, nicht aber oder nur sehr wenig in einer Mischung beider Lösungen zu gleichen Teilen. Aus seinen

---

[1]) Mathews, Science 15, 492, 1902.

[2]) Zit. nach Albu und Neuberg, Physiol. u. Pathol. des Mineralstoffwechsels, Handbuch, 1906, 94.

[3]) Rendiconti della R. Accad. Lincei 11, 340, 392, 440, 1902.

[4]) Centralbl. f. Physiol. 20.

Kurven geht deutlich hervor, daß Natriumchlorid und mehr noch Zucker die Auflösung in allen Konzentrationen bewirkt, während eine Mischung von 0,119 mol. NaCl und 0,217 Saccharose keine Wirkung ausübt. Und da die Löslichkeit der roten Blutkörperchen auch in hypertonischen Lösungen stattfindet, so ist es zweifellos, daß beide Körper wahre Gifte für sie sind.

Wir bewiesen dasselbe für die roten Blutkörperchen des Frosches[1]) in isotonischen Kochsalzlösungen, welche sie eine kurze Zeit anscheinend unverletzt lassen, sie dann aber stark angreifen. Wir bewiesen auch, daß die Lösung erst wirklich physiologisch wird, wenn das Kochsalz anstatt in destilliertem Wasser in Brunnenwasser gelöst wird, welches Carbonate enthält, oder in destilliertem Wasser, in dem eine geringe Menge Calciumcarbonat durch Kohlensäure aufgelöst wird.

Die Literatur liefert uns also ein äußerst reichliches Material, aus dem hervorgeht, daß gelöste Körper von Tier- und Pflanzenzellen aufgenommen und wieder nach außen befördert werden.

Aber es gibt auch direkte Beweise: Die Hefen scheiden nach Nägeli[2]) in einem alkalischen Milieu Eiweißkörper aus, in einem saueren Medium Kohlenhydrate. Bei Drosera wird durch einfachen mechanischen Reiz oder mittels einer sehr verdünnten Ammoniumcarbonatlösung eine reichliche Ausscheidung durch die Tentakel bewirkt. Die Nectarien scheiden Zucker aus, welcher nach Wilson[3]) zur Ursache der Wasserausscheidung aus demselben Organen wird. Wenn der Mais aus einer Nährlösung in destilliertes Wasser überführt wird, scheidet er innerhalb 25 Tagen 0,0194 g anorganische Körper aus, unter denen Kalium, Calcium und Phosphorsäure sind. Unter gleichen Bedingungen scheidet Phaseolus nach 5 Tagen reichliche Mengen von Kalium, Calcium, Ammonium, gebundene Schwefelsäure, freie und gebundene Phosphorsäure und einen Kohlenstoff enthaltenden Körper aus.[4])

---

[1]) Archivio di fisiologia 3, 572, 1906.

[2]) Theorie der Gärung München S. 91, 1879.

[3]) Unters. a. d. bot. Institut Tübingen 1, 1881.

[4]) Knop, Quantitativ-analystische Arbeiten über den Ernährungsprozeß der Pflanzen. Landw. Versuchsstation 3, 1861.

Die Wurzeln scheiden aus ihren Haaren und Epithelien Kaliumphosphat und Kohlensäure aus.[1])

Wenn Cochlearia in einer Natriumchloridlösung 0,42 mol., 24,54‰, gezüchtet wird, findet man auf den Blattflächen Natriumchlorid ausgeschieden. Eine derartige Ausscheidung findet auch auf den Blättern von Phaseolus statt, welche in einer Kaliumnitratlösung gezüchtet werden. Eine derartige Ausscheidung findet auch auf den Blättern einiger Wüstenpflanzen statt und besteht dort aus Natriumchlorid, Calcium- und Magnesiumsalzen.[2])

Im übrigen wäre ja augenscheinlich ohne eine derartige Permeabilität der Zellen überhaupt jeder Nährstrom ausgeschlossen, wie die Ernährung des Embryos durch Eiweiß, die Kohlensäureausscheidung in der Pflanzenatmung, die Kalkkrusten bei Chara, verschiedenen Algen, bei gewissen Spezies von Potamogeton und Saxifraga[3]) zeigen.

Overton[4]) sah außerdem den in tanninhaltigen Zellen durch schwache Alkaloidlösungen verursachten Niederschlag verschwinden (Protesomen von Loew und Bokorny), wenn er mit Wasser verdünnte, und sah dann den Niederschlag wieder zunehmen, wenn er den Alkaloidzusatz vermehrte. Overton hat außerdem[5]) beobachtet, daß gestreifte Muskeln ihre Kontraktilität in einer 6%igen Saccharoselösung schnell einbüßen, und zwar nicht durch Eintritt des Zuckers, sondern durch den Austritt des Natriumchlorids aus den Flüssigkeiten zwischen den Muskelfasern. Denn es ist bekannt, daß die Natriumionen nicht nur notwendig für die Kontraktilität sind, sondern auch für die Fortpflanzung der Reizbarkeit durch den Muskel.

Um den Austritt von organischen und anorganischen Stoffen durch die Haut zu untersuchen, stellten wir Versuche an lebenden Fischen, an einem Süßwasserfisch „Leuciscus" und einem Meerfisch „Conger vulgaris", an.

Dazu war vor allem nötig, etwaige Hautausscheidungen

---

[1]) Crapek-Pringsheims Jahrb. 29, 321, 1896.

[2]) Volkens, Flora d. ägyptisch-arabischen Wüste, Berlin 1887.

[3]) Rysselberghe, Réaction osmotique des cellules végétales, Bruxelles 1899.

[4]) Festschrift d. Naturforsch.-Gesellsch. in Zürich 2, 1896.

[5]) Pflügers Archiv 92, 1902.

von den Stoffwechselprodukten zu trennen. Wir hatten außerdem mit folgenden Schwierigkeiten zu kämpfen: Ausschaltung der Kohlensäure und der Exkremente.

Dies bestimmte die folgende Versuchsanordnung. Die gutgenährten Leuciscus wurden 2 Tage ohne Nahrung in Trinkwasser gehalten und dann 2 Tage in völlig freiem destillierten Wasser, um so etwa zurückgebliebene Exkremente entleeren zu lassen.

Die Fische wurden dann dreimal mit dest. Wasser gewaschen, und in einen Kolben aus Jenaglas mit einer abgemessenen Menge dest. Wassers gebracht. Dieselbe Menge dest. Wassers wurde in einem gleichen Kolben neben den Fischen aufgestellt, um etwaige zufällige Schwankungen in der elektrischen Leitfähigkeit des der Luft ausgesetzten Wassers abziehen zu können. Es wurde dann periodisch das Versuchswasser in ein völlig reines Jenaglas gebracht, genau gemessen, nachdem es in einem Wasserbade auf 15° erwärmt worden war, und dann das elektrische Leitungsvermögen geprüft. Außerdem wurde durch Verdampfung und Wägung die Substanzmenge festgestellt, welche aus den Fischen in das Wasser übergegangen war. Durch Verbrennung wurde die Menge der anorganischen Substanzen festgestellt, die der organischen ergab sich aus der Differenz.

Es zeigt sich dann, daß nach 27 Hungertagen noch organische und anorganische Substanzen ausgeschieden werden, welche jedenfalls nicht alle aus dem Darm und den Atmungsprodukten stammen.

Während die Stoffausscheidung in den ersten 15 Tagen mit einer gewissen Regelmäßigkeit erfolgte, nimmt sie dann schnell ab, um ein Minimum zu erreichen, wahrscheinlich wenige Tage vor dem Hungertode.

Das bedeutet, daß der Fischorganismus bei relativem Wohlbefinden eine fast konstante Menge von organischen und unorganischen Substanzen ausscheidet bis zur Erschöpfung desjenigen Maßes, welches über das absolute Bedürfnis des Organismus hinaus in diesem vorrätig ist. Dieses Verhalten der Fische weicht von dem der warmblütigen Tiere und des Menschen ab, bei denen die Ausscheidung organischer und unorganischer Substanzen während des Hungers gleich nach dem ersten Tage abzunehmen beginnt, wie u. a. Imm. Munk und Luciani beobachtet haben.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse unserer Experimente zusammengestellt:

Datum	Spezies der Fische	Zahl der Fische	Wasser in Berührung mit den Fischen	Leitungsvermögen		In 100 ccm Wasser in Berührung mit den Fischen		Im ganzen Volumen		In einem Tage ausgeschieden	
				des Kontrollwassers	des Wassers in Berührung mit den Fischen	Organische Substanzen g	Mineralsubstanzen g	Organische Substanzen g	Mineralsubstanzen g	Organische Substanzen g	Mineralsubstanzen g
18. Dezbr. 1907	Leuciscus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20. „ „		9	114	$10^{-8} \cdot 723$	$10^{-7} \cdot 2092$	0,0046	0,0024	0,00524	0,00274	0,00262	0,00137
23. „ „		9	135	$10^{-8} \cdot 585$	$10^{-7} \cdot 1242$	0,0080	0,0026	0,0108	0,0035	0,00360	0,00116
25. „ „		9	134	$10^{-8} \cdot 546$	—	0,0054	0,0020	0,0072	0,0027	0,00360	0,00130
29. „ „		9	153	$10^{-8} \cdot 426$	$10^{-7} \cdot 2459$	0,0055	0,0032	0,0084	0,0049	0,00280	0,00163
4. Januar 1908		9	167	—	$10^{-7} \cdot 2250$	—	—	—	—	—	—
10. „ „		9	151	$10^{-8} \cdot 415$	$10^{-7} \cdot 2012$	0,0052	0,0010	0,0079	0,0015	0,0013	0,00025
14. „ „		9	157	$10^{-8} \cdot 430$	$10^{-7} \cdot 1472$	0,0022	0,0023	0,0035	0,0036	0,0009	0,0009

In 5 Minuten ausgeschiedene Substanzen	g	0,00532	0,00482	0,00472
Im angewendeten Volumen gelöste Substanzen	g	0,04788	0,03374	0,05670
Differenz		0,0383	0,02775	0,04725
In 1 Liter nachher gelöste Substanzen	g	0,04800	0,04950	0,07200
In 1 Liter anfangs gelöste Substanzen	g	0,00975	0,02175	0,02475
Leitungsvermögen des Wassers nach der bestimmten Zeit		$10^{-6}.64$	$10^{-6}.66$	$10^{-6}.96$
Leitungsvermögen des Wassers sofort nach dem Einbringen		$10^{-6}.13$	$10^{-6}.29$	$10^{6}.33$
Dauer des Aufenthaltes in Minuten		45	35	60
Volumen des Wassers in Berührung mit d. Fischen	ccm	1250	1216	1200
Totalgewicht	g	67	67	67
Nr. der Fische		3	3	3
Datum		1. März 1908	3. „ „	5. „ „

Von da an abwärts fängt der Verfall an, d. h. die Ausscheidung, der dem Organismus unbedingt nötigen Stoffe.

Und die ausgeschiedenen Stoffe müssen in einer Form abgegeben werden, in der sie von dem Tier in keiner Weise mehr durch Wiederaufnahme verwendet werden können, auch nicht während des absoluten Hungers.

Wir haben die Versuche mit ungefähr demselben Resultat bei Seefischen, z. B. Conger vulgaris, angestellt.

Die Versuchsanordnung mußte jedoch abgeändert werden, da die Fische nur kurze Zeit (2 bis 3 Stunden) im destillierten Wasser leben konnten.

Es wurde deshalb jedesmal, sofort, nachdem die Fische in das destillierte Wasser gebracht waren, davon eine Probe entnommen und im Apparat von Kohlrausch geprüft, der Rest nach Beendigung des Versuchs.[1])

Die Leitfähigkeit wurde in diesen Versuchen stets nach dem Austreiben der flüchtigen Stoffe geprüft, welche deren Wert besonders durch die Respirationsprodukte ändern konnten. Die Austreibung wurde folgendermaßen bewirkt: es wurde in einem Jenakolben 100 ccm Versuchswasser bei 15° abgemessen.

[1]) Kohlrausch u. Holborn, Leitvermögen der Elektrolyte 1898, S. 131. — A. Scala, Annali d'Igiene speriment. 1907, 665.

Dieses wurde in einer Porzellanschale während einer 1/2 Stunde auf einem kochenden Wasserbade erwärmt. Nach erfolgter Abkühlung wurde das Wasser in den ursprünglichen Kolben zurückgegossen und auf das ursprüngliche Volum durch Hinzufügen von reinstem destillierten Wasser bei 15° gebracht.

Die Resultate sind in vorstehender Tabelle (S. 456) zusammengestellt.

Auch in dieser Tabelle zeigt sich die große Regelmäßigkeit in der Ausscheidung der löslichen und ionisierten Körper in der Zeiteinheit. Auch in diesem Falle können die Ausscheidungsprodukte nicht, oder nur zum kleinsten Teile auf Rechnung des Darmes gehen, um so mehr, da die Fische nach mehrtägigem Hunger nur ganz kurze Zeit im destillierten Wasser zubrachten.

Diese Ausscheidungen gehen jedenfalls außer auf Kosten der Rachenschleimhaut auch auf den Schleimüberzug, mit dem sich der Fisch sofort nach dem Einbringen in das destillierte Wasser bedeckt, welcher sich dann ablöst und in Flocken im Wasser schwimmt.

Um die Exkremente völlig auszuschalten und zu beachten, inwieweit die Schleimhäute an der Ausscheidung teilnehmen, stellten wir folgenden Versuch an: Ein Conger wurde mit dem Kopfe nach unten — die gewöhnliche Haltung dieser aalförmigen Fische — in eine enge Jenaglasröhre gesteckt, so daß der Fisch weder entweichen noch sich umwenden konnte. Diese Röhre wurde mit dem Fische in ein Jenaglasgefäß getaucht, so daß nur der Kopf des Fisches sich in dem destillierten Versuchswasser befand.

Die Resultate dieses Versuches ergeben sich aus umstehender Tabelle (S. 458).

Hierbei stellt sich nun heraus, wie stark die Schleimhäute des Rachenapparates an der Ausscheidung beteiligt sind. Die große Menge der ausgeschiedenen Substanzen (fast das doppelte wie bei den vorhergehenden Experimenten) geht wohl indirekt auf Rechnung des Nervensystems. Die Aufregung des Fisches in der engen Röhre zeigt sich in den ungeheuren und vergeblichen Anstrengungen, die er machte, um zu entweichen.

Datum	Spezies der Fische	Nr. der Fische	Wasser in Berührung mit den Fischen	Dauer des Aufenthaltes in Minuten	Leitungsvermögen des Wassers sofort nach dem Einbringen	Leitungsvermögen des Wassers nach der bestimmten Zeit	In 1 Liter anfangs gelöste Substanzen g	In 1 Liter nachher gelöste Substanzen g	Differenz	Im angewendeten Volumen gelöste Substanzen g	In 5 Minuten ausgeschiedene Substanzen g
4. 1. 08	Carassius auratus	1	—	20	$10^{-8}.428$	$10^{-7}.485$	0,00319	0,0364	0,0334	—	—
7. 5. 08	Conger vulgaris	3	150	60	$10^{-6}.71$	$10^{-6}.927$	0,05325	0,69525	0,64200	0,09630	0,00800

Lokalisierte Permeabilität.

Bis jetzt haben wir die Plasmamembranen an ihrer ganzen Oberfläche als gleichmäßig durchlässig betrachtet. Aber diese allgemeine Durchlässigkeit ist nicht in allen Zellen vorhanden. Wenn man das Leben der Einzelligen betrachtet und die sehr verschiedenen Funktionen, die sich in einer einzigen Zelle abspielen, ist eine derartige gleichmäßige Durchlässigkeit schon a priori unwahrscheinlich. Aber auch wenn wir die Zellen der Vielzelligen betrachten, geht aus der oberflächlichsten Anschauung hervor, daß wohl keine von ihnen überall an ihrer Peripherie zu den Nebenzellen in dem völlig gleichen Verhältnisse steht. Diese Unterschiede müssen einen gegenseitigen Einfluß auf die Permeabilität benachbarter Zellen ausüben.

Unsere Versuche wurden an einzelligen Pflanzen und Tierzellen angestellt.

Im Jahre 1896 fand einer von uns, daß in der Opalina Ranarum, einem in der Kloake des Frosches vorkommenden Protozoon ohne Mundöffnung von fast zylindrischer Form, die Durchlässigkeit für Farbstoffe im lebenden Tier auf einen Teil seiner Oberfläche beschränkt sei. Diese partielle Durchlässigkeit beweißt, daß die Opalina nicht chemisch homogen an ihrer Oberfläche ist. Wenn ihr unter dem Mikroskop ein Strom schädlicher Flüssigkeit zugeführt wird, so weicht sie mit dem vorderen, undurchdringlichen

Körperende zurück. Spätere Untersuchungen[1]) von uns haben diese Beobachtung bestätigt und erweitert. Wenn die Opalinen in eine isotonische Natriumchloridlösung gebracht werden, so schwillt nach einiger Zeit das hintere Ende an, welches schließlich platzt, wobei hyalines Plasma austritt. Wenn die Opalinen in destilliertes Wasser gebracht werden, löst sich ihr hinteres Ende auf, während sich an dem vorderen noch die Wimpern bewegen. Wenn den isotonischen Natriumchloridlösungen etwas Eosin zugesetzt wird, so dringt der Farbstoff vom hinteren Ende aus ein.

Gegen die homogenen Zelloberflächen sprechen auch die Explosionen der Zellspitzen in Pflanzenzellen und besonders auch die Befunde Pantanellis an den Spitzenzellen von Penicillium.[2]) Diese Zellen werden in salzhaltigen Nährflüssigkeiten, seien diese nun hyper- oder hypotonisch, keulenförmig, da sie Wasser von der Spitze aus aufnehmen, und zwar nicht durch den veränderten Druck in hypertonischen Lösungen, sondern durch den veränderten Chemismus.

Interessant sind auch die Beobachtungen von Frau Sokolowa[3]) an den Spitzenzellen der Wurzelhaare, welche, wenn sie aus einer Zuckerlösung in andere Zucker- oder Salzlösungen übergeführt werden an der Spitze Verdickungen bilden, welche sich längs der Zellwände ausdehnen. Diese Verdickungen stammen nach Ansicht der Verfasserin aus einer stufenweisen Umwandlung des Protoplasmas in junge Cellulose, während sie nach Pantanelli von einer Reizung des Protoplasmas herrühren, welches sich kontrahiert und Cellulose zurückläßt. In jedem Falle ist die spezifische Funktion der Zellspitze klar, welche jedenfalls mit einer größeren Permeabilität der sogen. Plasmahaut oder vielleicht besser noch der Zellhaut und der Plasmaoberfläche in Beziehung zu bringen ist, welche an dieser Stelle vorzugsweise die Eigenschaft besitzen, Nährstoffe von außen aufzunehmen.

Diese Art unserer Auffassung wird durch die von uns beobachteten Tatsachen an fadenförmigen Algen, Cladophora und Spirogyra, unterstützt.

---

[1]) Archivio di Fisiologia 4, 609, 1907.

[2]) Pantanelli, Contribuzione alla meccanica dell'accrescimento.

[3]) Zitiert bei Pantanelli.

Wenn wir Cladophora in eine wässerige Lösung von Magnesiumchlorid brachten, welche isoelektrisch mit einer Lösung von 0,7 % Natriumchlorid war, fanden wir nach 24 bis 48 Stunden eine Verdickung der transversalen Quersepte, welche sich an den Längswänden hinzieht bis zu einem Drittel ihrer Länge. Diese Verdickung findet weder in isoelektrischen Lösungen von Natrium- noch von Kaliumchlorid statt, wohl aber in einer 3 bis 5 % igen Natriumchloridlösung.

Dies beweist außer den verschiedenen Wirkungen der Kationen in isoelektrischen Lösungen auch eine eigene Permeabilität der Zell- und Plasmahaut an den Quersepten.

Die Verdickung, welche von den Quersepten ausgeht, d. h. von einer Stelle, von der wir zeigen werden, daß von dort aus Salze und Farbstoffe aus dem äußeren Medium aufgenommen werden, wirkt also bei der Pflanze als Verteidigung gegen das Eindringen von schädlichen Körpern und darf nicht nur wie ein mechanisches Eindringen von den Lösungen am Orte des geringsten Widerstandes betrachtet werden, da gerade dort bei den Fadenalgen die Zellhaut am dicksten ist. Die Verdickung hat hingegen einen chemischen Ursprung, da die Quersepten augenscheinlich eine von dem Reste der Zell- und Plasmahaut verschiedene chemische Zusammensetzung haben. Dies wird durch folgende Beobachtung bewiesen. Wenn wir die Algen nach deren Verweilen in isoelektrischen Lösungen von NaCl, KCl oder $MgCl_2$ mit einem sehr geringen Zusatz von Eosin zu den obengenannten Lösungen färbten, so trat die Färbung nur an den Quersepten auf, genau so, als ob diese in allen Zellen aus junger Cellulose und der Rest der Zellen aus alter beständen. Ein anderer Grund spricht noch außerdem für eine verschiedene Beschaffenheit der beiden Quersepten derselben Zelle: wenn wir Spirogyrafäden in eine Lösung von 0,7 % KCl tauchen, so finden wir sie nach einigen Stunden in den Quersepten durchteilt und jede Zelle frei in der Lösung schwimmen. Das Kaliumchlorid löst also den Quersept auf, ohne die übrige Zellhaut im mindesten anzugreifen.

Ein ähnlicher Prozeß ist von Eschenhagen[1]) geschildert worden. Dieser setzte junge Pilzhyphen aus einer konzen-

[1]) S. bei Pantanelli, Annali di botanica del Prof. Pirotta, 2, 321.

trierten Lösung in eine verdünnte und fand dann die Zellhaut an den Septen der einzelnen Glieder zerstört und die Zellhaut an den Zellspitzen geplatzt. Dies beweist auch in diesem Falle entweder einen geringeren Widerstand oder eine andere chemische Zusammensetzung der betreffenden Membranstellen. In einem besonderen pathologischen Falle fanden wir auch andere Stellen der Zellmembran durchlässig und mit Eosin gefärbt. Während einer Diatomeenepidemie, welche die Algen in einer Fontäne überfallen hatte und bei der die Algenfäden ihrer ganzen Länge nach wie in einem Diatomeenpanzer steckten, lösten sich letztere in Lösungen von Kalium- wie von Magnesiumchlorid nach einigen Tagen ab. Als wir die Cladophoren dann mit Eosin färbten, fanden wir nicht nur scharf umrandete rote Flecke auf der Zellhaut, wo die Diatomeen befestigt waren, sondern diesen entsprechend ebenfalls rote Flecke im Protoplasma. Die Diatomeenausscheidung hatte also eine chemische Veränderung und Permeabilität bewirkt. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine andere Ausscheidung als die, welche die Fortbewegung der Diatomeen ermöglicht, da diese hier im Gegenteil dazu diente, sie an den Algen festzukleben.

Die protoplasmatischen Quersepten.

Wir bezeichnen so den Teil des Protoplasmaschlauches, welcher den Zellsepten anliegt.

Auch dieser Teil des Protoplasten scheint eine vom übrigen verschiedene chemische Konstitution zu haben. So z. B. beginnt die Plasmolyse stets dort, und dort beginnt auch die Bildung der „Proteosomen" von Loew und Bokorny, in Lösungen von 1 °/₀ Coffein und 1 : 5000 Ammoniak. Bei der Proteosomenbildung macht sich auch ein Unterschied bei den Quersepten derselben Zelle in vielen Fällen geltend. Wir beobachteten, daß in ungefähr der Hälfte der Zellen die Bildung dieses an einem der Septen beginnt, woselbst sie sich in so großen Mengen anhäufen, daß die Zelle undurchsichtig bis zur Hälfte und mehr wird, während sie am anderen Pol völlig durchsichtig bleibt. Dieser Unterschied bleibt bestehen und ist von uns noch beobachtet worden, nachdem die Zellen, die übrigens wieder ganz normal nach Auswaschen mit Trinkwasser wurden, 7 Stunden in der Coffeinlösung verweilt hatten. (Fig. 18.)

Es scheinen also auch die Quersepten in derselben Zelle verschieden zu sein. Wenn nämlich die Algen in den Salzlösungen anfangen, zu leiden, so wird der eine Quersept vorgewölbt, während der andere entweder bleibt wie er war oder konkav wird, während doch der Druck im Zelleninnern überall gleich bleiben muß. Es scheint, daß der konvexe Sept stets der der Spitze des Fadens zugewandte ist.

Es ist außerdem bekannt, daß das Austrocknen der Algenfäden so gut wie gar keine Längenverkürzung bewirkt, während sie in der Breite so austrocknen, das die Längswände sich aneinanderlegen. Auch dies weist auf einen chemischen Unterschied der Quersepten hin, welche nicht nur schneller eintrocknen, sondern auch völlig schrumpfen.

Die von Pfeffer angegebenen schwachen Lösungen zum Studium der Plasmolyse haben übrigens außer vielen Vorteilen den Nachteil, daß sich in ihnen der Protoplast nicht von der ganzen Zellwand loslöst und so die Permeabilität des Protoplasten von der der Zellhaut abhängig bleibt. Solange diese für so gleichmäßig durchlässig gehalten wurde wie der Tonzylinder in der Form, welche Pfeffer der Traubeschen Zelle gegeben hat, war das gleichgültig, ist es aber natürlich nicht mehr, wenn die Permeabilität der Zellhaut, wie wir für die Algenzelle im physiologischen Zustande annehmen, nur an den Quersepten für verschiedene Flüssigkeiten und zwar an den einen mehr, an den anderen weniger durchlässig ist.

In diesem letzteren Falle kann der wirkliche Ort des Eindringens von Lösungen in das Protoplasma nur beobachtet werden, wenn dieses ringsum durch eine genügend kräftige Zusammenziehung desselben an seiner ganzen Peripherie von der Zellhaut losgelöst wird.

Eine 3 $^0/_0$ige Natriumchloridlösung ist für Spirogyra für diesen Zweck die geeignetste, wenn die Alge vorher in destilliertem Wasser längere Zeit verweilte. Wir erhielten auf diese Weise eine ganz regelmäßige Plasmolyse ohne eine Spur von sichtbaren Zerreißungen oder Deformationen des Protoplasten. Daß die Zelle während unserer Beobachtungen lebte, geht erstens aus der plasmolytischen Kontraktion selbst hervor, zweitens aber auch aus der turbulenten Bewegung von außerordentlich feinen Niederschlägen, welche sich unter dem Mikroskop

in nichts von den Loew und Bokornyschen Proteosomen unterschieden. In der 3 % igen Natriumchloridlösung plasmolysieren die Algenzellen nach 2 Typen, welche gelegentlich bereits von verschiedenen anderen, hauptsächlich von de Vries beschrieben wurden, ohne daß die Autoren ihnen eine physiologische Bedeutung beimaßen. Der erste ist die klassische von Pfeffer geschilderte Form, in der der Protoplast in der Mitte der Zelle als regelmäßiges Elipsoid liegt. Bei dem zweiten Typus hingegen dringt die Lösung von außen durch beide Quersepten so ein, daß sie im Protoplasten an jedem Pole eine regelmäßige Vakuole bildet.

Im ersten Falle zieht sich bei Spirogyra die Spirale so zusammen, daß sie schließlich, wenn auch nur scheinbar, eine einzige Masse bildet und der Protoplast wird, wie bekannt, stark lichtbrechend; die Quersepten werden konkav. Nach ungefähr 20 Minuten fängt der Protoplast an sich wieder auszudehnen und die Spirale wird wieder sichtbar. Darauf bilden sich Hernien, fast stets zwei, welche sich bis in die Septenwinkel erstrecken, ohne daß irgendwelche Zerreißungen sichtbar würden. In diesen Hernien beginnt, dort wo sie den Zellhautsepten anliegen, die Proteosomenbildung unter heftigster Bewegung der feinen Niederschläge.

Im zweiten Typus treten die Proteosomen in den Vakuolen, während diese sich vergrößern, viel früher und mit derselben heftigen Bewegung auf und füllen auch hier schließlich die ganze Zelle, bis sie undurchsichtig wird, während die heftige Bewegung der Proteosomen andauert, solange eine Beobachtung möglich ist.

Beide Typen der Plasmolyse treten regelmäßig in jedem Algenfaden auf.

Es scheint dies auf einem fundamentalen Unterschied in den Zellen selbst zu deuten: im ersten Falle bleiben die Quersepten unverändert, und die Proteosomenbildung findet nur statt, wenn die Entplasmolysierung bereits so weit vorgeschritten ist, daß die Hernien die Quersepten berühren. Im zweiten Falle werden die Quersepten konvex und die Proteosomenbildung beginnt sofort gleichzeitig mit der Bildung der Vakuolen. Es scheint also, als ob der Protoplast im ersten Falle weniger leicht für Natriumchlorid durchlässig ist als im zweiten Falle.

Damit hängt jedenfalls zusammen, daß der Druck wie aus der Ausbuchtung der Quersepten im zweiten Falle hervorgeht, in diesen letzteren Zellen größer ist.

Das, was uns nach unseren Beobachtungen sicher scheint, ist, daß der Eintritt der Salze in die Zellen durch Quersepten stattfindet, und zwar sowohl durch die Zellhaut als in den Protoplasten.

Daraus folgern wir, daß an diesen Stellen die Zellhaut sowohl als die Oberfläche des Protoplasten (Plasmahaut) chemisch verschieden von dem Reste der Zellhaut und des Protoplasten sind und daß das Natriumchlorid an diesen Stellen vorzugsweise Stoffe trifft, mit denen es labile Verbindungen eingeht, oder daß diese Stoffe an dieser Stelle in einem Zustande sind, in dem sie leichter Natriumchlorid aufnehmen können als an anderen Stellen des Protoplasten.

Untersuchungen über die Wirkung der Kationen Na, K, Mg.

Wir haben auch für diese Untersuchungen Cladophora und Spirogyra aus dem römischen Leitungswasser verwendet, welches von der „Acqua Marcia“, einem vorzüglichen Trinkwasser, gespeist wird, das jedoch eine ziemliche Menge kohlensaurer Erden enthält und also leicht kalk- oder andere derartige Ablagerungen auf im Wasser befindlichen Gegenständen, besonders im Sommer zu Folge hat.

Cladophora.

Methode: Die Algen wurden aus dem Leitungswasser in destilliertes Wasser gebracht und mehrfach darin gewaschen. Dann wurden fünf möglichst gleiche kleine Mengen in etwas Versuchslösung gebracht, um auf diese Weise das destillierte Wasser abzuspülen. Nach einigen Stunden wurden sie in drei kleine Jenakolben gebracht, welche dieselbe Menge Versuchsflüssigkeit enthielten, d. h.: 1. 0,7 %iges Natriumchlorid; 2. mit diesem isoelektrisches Kaliumchlorid; 3. isoelektrisches Magnesiumchlorid; 4. völlig reines destilliertes Wasser und 5. Acqua Marcia zur Kontrolle. Die fünf Gläschen wurden in dieselbe Temperatur und Beleuchtung gebracht, Tageslicht, aber keine direkte Sonne.

Cladophora im destillierten Wasser. In diesen Beobachtungen können wir bestätigen, daß die Algen vorzüglich in

destill. Wasser leben, daß sie also gegen ziemlich beträchtliche Druckveränderungen gar nicht[1]) empfindlich sind. Sogar, wenn sie nach einigen Tagen aus dem destill. Wasser wieder in Acqua Marcia zurückversetzt werden, dem 0,5% Natriumchlorid zugesetzt wird, leben und wachsen sie vorzüglich weiter. Bleibt jedoch die Alge (es gilt dies auch für die anderen Fadenalgen) länger als ungefähr 8 Tage im destill. Wasser, so beobachteten wir an den Quersepten eine beginnende Korrosion, wahrscheinlich eine Art Auswaschung des Protoplasten. Diese bleibt bestehen, bis nach ungefähr einigen zwanzig Tagen der Protoplast während des Absterbens sich auflöst. Bis zu zwanzig Tagen und länger schwimmt die Alge aber unter erst reichlicher, dann abnehmender Gasentwicklung an der Oberfläche und behält ihre kräftig grüne Farbe.

Die Korrosion hat wahrscheinlich ihre Ursache in dem Austreten von Eiweißkörpern, welche durch das Verschwinden der Salze und das Eintreten des Wassers durch die Quersepten in Lösung übergeführt werden. Durch die Quersepten tritt auch das Eosin in die Zelle, welches die desorganisierten Teile färbt (Fig. 11).

In diesem Falle handelt es sich nicht um Hungerplasmolyse, d. h. um Kontraktion des Protoplasten nach Verbrauch der Reservestoffe, denn mangelhaft ernährte Algen (ungenügend belichtet oder salzbedürftig) haben einen nur ganz wenig verkürzten, aber nicht abgerundeten Protoplasten, dessen Quersepten denen der Zellhaut parallel bleiben.

Natriumchlorid: Nach 38 Stunden zeigt sich eine leichte Abnahme des Protoplasten am Quersept.

Nach 3 Tagen ist die Abnahme augenscheinlicher.

Nach 4 Tagen ist die Abnahme noch merklicher, wenngleich immerhin sehr gering. In den Fäden sind einige abgestorbene Zellen zerstreut, welche sich mit Eosin färben.

Nach 7 Tagen macht die Abnahme des Protoplasten den Eindruck einer beginnenden Plasmolyse. Einige abgestorbene Zellen färben sich mit Eosin.

Nach 10 Tagen ist die Zurückziehung des Protoplasten vom Quersept verschwunden; die Chlorophyllkörner haben ab-

---

[1]) Rysselberghe, Acad. Royale de Belgique 58, 1899.

genommen und heben sich deutlich von dem farblosen Zellsafte ab, während sie früher so dicht waren, daß sie wie eine grüne Masse aussahen. Mehr abgestorbene, mit Eosin färbbare Zellen. An vielen grünen Zellen ist nur der Quersept rot gefärbt.

Charakteristisch für das Natriumchlorid ist die perfekte Erhaltung der Form der Chlorophyllkörner, welche sogar noch nach dem gänzlichen Verschwinden des Chlorophylls erhalten bleibt.

Kaliumchlorid: Nach 24 Stunden ist der Protoplast leicht von den Quersepten abgelöst.

Nach 5 Tagen eine ausgesprochene Deformation der Chlorophyllkörner und viele tote Zellen, welche sich mit Eosin färben.

Nach 6 Tagen ist die Korrosion des Protoplasten sehr stark fortgeschritten; viele Chlorophyllkörner haben eine ganz unregelmäßige Form und beginnen, sich aufzulösen. Viele tote Zellen und viele mit Eosin gefärbte Quersepten.

Nach 9 Tagen sind in den grünen Zellen (d. h. nicht durch Eosin färbbaren) die Chlorophyllkörner fast ganz aufgelöst; der Zellinhalt ist fast homogen mit wenigen unregelmäßigen Körnern und fast einförmig hellgrün gefärbt.

Magnesiumchlorid: Nach 24 Stunden sind die Fäden anscheinend völlig normal.

Nach 7 Tagen leichte Abnahme des Protoplasten an einigen Quersepten; die Chlorophyllkörner sind normal. Wenige tote Zellen färben sich mit Eosin.

Auffallend ist die Neubildung der Cellulose an den Quersepten, welche sich an den Seiten, bis gegen die Mitte der Zellhaut abnehmend, verlängert. Diese Neubildung findet niemals an beiden Enden einer Zelle statt.

Die junge Cellulose färbt sich stärker mit Eosin als die toten Zellen und enthält noch umgewandelte gut erkennbare Körner des Protoplasten, welche ebenfalls rot gefärbt sind und für eine direkte Umwandlung des Protoplasten in Cellulose an seiner Peripherie sprechen und nicht für Zurückziehung desselben nach Ausscheidung von Cellulose.

In den darauffolgenden Tagen ist die junge Cellulose ganz homogen, stärker lichtbrechend und noch intensiver mit Eosin färbbar.

Die Algen in der Acqua Marcia erhalten sich während der

Versuchstage in normalem Zustande; nur an den Quersepten ist der Protoplast, aber sehr viel weniger als in den Salzlösungen, zurückgezogen.

In den hier geschilderten Versuchen konnte die Gegenwart von kohlensauren Erden in den Algen nicht ausgeschlossen werden, welche die Wirkung der Chloride schwächen, da sie einerseits neutralisierend als Carbonate wirken, und andernteils ihre Kationen Ca_2 und Mg_2 der Verflüssigung des Protoplasmas entgegenwirken. Die Algen, mit denen bisher von uns experimentiert wurde, waren nur mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen worden, ohne während längerer Zeit darin zu leben.

Wir haben deshalb eine zweite Reihe von Versuchen mit Algen angestellt, welche 10 Tage in täglich gewechseltem destilliertem Wasser gehalten waren, um auf diese Weise möglichst von im Protoplasma angehäuften oder außen anhaftenden Salzen gereinigt zu werden.

Der Unterschied in beiden Experimenten besteht erstens in einer Beschleunigung der Chloridwirkung, zweitens aber in einer veränderten Wirkung des Magnesiumchlorids. Während dieses in den ersten Experimenten weniger schädlich als das Natriumchlorid wirkte, machte es sich in den entsalzten Algen bei weitem schädlicher geltend.

Spirogyra.

Methode: Die Algenfäden wurden mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und dann in destilliertem Wasser 5 bis 10 Tage gezüchtet.

Nur in einem Falle haben wir Algen nach einem Aufenthalt von wenigen Stunden in destilliertem Wasser benutzt. Es waren dies Fäden aus einer ganz jungen Spirogyrakolonie, welche einer kürzlich gereinigten Fontäne entstammten, in der sie noch frei von Kalkinkrustationen waren.

Im übrigen wurden die Algen wie Cladophora behandelt.

Natriumchlorid: Nach 4 Stunden schwimmen die Algen an der Oberfläche mit reichlicher Gasentwicklung.

Nach 48 Stunden hat die Gasentwicklung abgenommen; wenige abgestorbene mit Eosin gefärbte Zellen; an einigen lebenden Zellen ist ein Quersept mit Eosin gefärbt (Fig. 7). Die

Spirale ist regelmäßig, hat aber ihre natürlichen Zacken durch Anschwellung verloren.

Nach 60 Stunden ist die Spirale fast in allen Zellen gequollen (Fig. 9) und ohne Zacken.

Kaliumchlorid: Nach 4 Stunden wie im Natriumchlorid, aber mit geringerer Gasentwicklung. Ziemlich viele abgestorbene Zellen, die sich mit Eosin färben. In fast allen lebenden Zellen ist die Spirale gequollen und an den Quersepten desorganisiert (Fig. 8). Sie ist dort, ohne Körner und Zacken, fast homogen. In der Folge quillt die Spirale in allen Zellen. Die Zerstörung fängt von den Quersepten an und erstreckt sich von da aus gegen das Zentrum.

Die Zerstörung ist an den Quersepten ausgesprochener. Diese selbst färben sich mit Eosin.

Nach ferneren 60 Stunden ist die Spirale in den meisten Zellen fast aufgelöst und färbt das Plasma grün.

Magnesiumchlorid: Nach 4 Stunden sind die Algenfäden bereits blasser und schwimmen unter geringer Gasentwicklung an der Oberfläche. Viele abgestorbene Zellen. In den gesunden Zellen ist die Spirale sehr gut erhalten.

In den meisten lebenden Zellen ist die Zellmembran an einem Quersept sehr verdickt, stark lichtbrechend und färbt sich kräftig mit Eosin. Im Plasma an einem der Quersepten beobachten wir bei einigen Zellen Granulationen in heftiger Bewegung. (Proteosomen, Fig. 10.)

Versuche an Spirogyra in 1 bis 4%igen Lösungen.

In diesen Lösungen tritt die Wirkung auf die Zellen so schnell ein, daß sie am Mikroskop verfolgt werden kann. Die dazu benutzten Spirogyrafäden lebten seit 10 Tagen in destilliertem Wasser, und die Beobachtungen wurden nur an völlig normal aussehenden Zellen angestellt.

Die Phänomene sind in 1 und 2%igen Lösungen im großen und ganzen gleich und hauptsächlich nur an Schnelligkeit und Intensität verschieden.

Wir schildern hier eine Spirogyrazelle in einer 2%igen Natriumchloridlösung. Es handelt sich hier um Quellungserscheinungen und nicht um eine wirkliche auf Hypertonie des

äußeren Mittels beruhende Plasmolyse. Eine solche erhielten wir erst in einer 3%igen Lösung.

Das stimmt mit den Angaben von de Vries überein, nach denen der innere Druck der Zellen in gutem Zustande zwischen 5 und 10 Atmosphären schwankt und auch bei ausgehungerten Zellen nie unter 3 Atmosphären sinkt. Unsere Zellen waren salzarm, aber nicht wirklich ausgehungert, da sie stets genügend belichtet waren (diffuses Tageslicht in Rom am Fenster). Eine 1%ige Natriumchloridlösung entwickelt nach der Formel von van t'Hoff 3,8 Atmosphären, 2 bis 3%ige Lösungen entwickeln ungefähr einen Druck von 7 bis 11 Atmosphären.

Die 2%ige Natriumchloridlösung war augenscheinlich um gerade eine Spur hypertonisch, wie aus den nun zu schildernden Vorgängen zu ersehen ist.

a) Sowie die Zelle mit der Salzlösung in Berührung tritt, zieht sich das hyaline Plasma leicht von den Quersepten zurück.

b) 3 von den 5 Schraubengängen der Spirale schwellen enorm, vom linken Quersept an gezählt, auf.

c) Der mittelste Schraubengang fängt an, sich abzurunden und verschmilzt mit dem zweiten links zu einer fast homogenen grünen Masse mit wenig unregelmäßigen Zwischenräumen. Die äußeren Ränder der Masse sind unregelmäßig saumförmig umgebogen.

d) Die Chlorophyllmasse dehnt sich aus und verschmilzt mit den beiden Schraubengängen rechts.

e) Der erste Schraubengang links schnürt sich ab und formt ein regelmäßiges Elipsoid.

In den hier beschriebenen Vorgängen handelt es sich um Quellungs- und Lösungserscheinungen der Spirale, welche gleich zu Anfang enorm aufschwoll, während es sich in der Plasmolyse durch ausgesprochene Hypertonie des äußeren Milieus um Schrumpfungserscheinungen in der Spirale durch Wasserentziehung handelt.

Die Lösung der Protoplasten, welche hier so schnell verläuft, entspricht dem, was wir in schwachen, d. h. 0,7%igen Kaliumchloridlösungen nach mehrtägiger Einwirkung beobachtet haben, während in einer dieser isohydrischen Natriumchloridlösung schließlich zwar das Chlorophyll ausgeschwemmt wurde, aber die Form der Körner erhalten blieb.

Mit einer 3 °/₀igen Natriumchloridlösung erzielten wir die bereits geschilderten Plasmolysen, welche nur selten mit dem Platzen des Protoplasten endigten.

In den 4 °/₀igen Lösungen verläuft die Plasmolyse äußerst schnell und heftig, und die ganze Zelle wird stark lichtbrechend; der Protoplast ist oft unregelmäßig plasmolysiert und platzt stets. Währenddem trat einige Male die Proteosomenbildung mit äußerster Heftigkeit der Körnchenbewegung auf, welche ebenso plötzlich mit dem Erstarren des abgetöteten Protoplasten still steht.

Wenn derselbe Versuch an Algen angestellt wurde, welche direkt aus der Acqua Marcia in die 4 °/₀ige Lösung übertragen werden, so plasmolysiert der Protoplast als regelmäßiges Elipsoid und erhält sich lange so, ohne sich wieder auszudehnen oder zu platzen.

Mineralsäure im Protoplasten nach Eindringen von NaCl.

Um zu beweisen, daß das Natriumchlorid auch in Pflanzenzellen sich mit den Eiweißkörpern zu natriumsauren Proteiden verbindet, wie wir es bei den Opalinen[1]) bewiesen haben, bedienten wir uns auch hier des Methylvioletts. Dies ist äußerst empfindlich gegen Mineralsäuren und geht in blau und grün über, während es in organischen Säuren die Farbe nicht wechselt. Wir brachten deshalb Spirogyrazellen in einem schwach mit Methylviolett gefärbten Tropfen einer 3 °/₀igen Natriumchloridlösung unter das Mikroskop, nachdem sie 20 Tage in destilliertem Wasser gezüchtet waren und also möglichst frei von kohlensauren Erden waren.

In den regelmäßig plasmolysierten Zellen (Fig. 17a) färbte sich der chlorophyllfreie Teil des Protoplasten blau. In den abgestorbenen Zellen färbten sich die die ganze Zelle erfüllenden Niederschläge violett; und violett wurden auch die entplasmolysierten Zellen nach dem Platzen des Protoplasten und dem dieses begleitenden Absterben (Fig. 17). Es ist wahrscheinlich, daß das Violettwerden nach dem Tode von einer nachträglichen Farbenspeicherung herrührt, aber es ist nicht ausgeschlossen, daß die Zelle nach dem Tode neutral oder alkalisch wird.

---

[1]) l. c.

Die Tier- und Pflanzenzellen reagieren also auf Natriumchlorid in identischer Weise. Die in Fig. 14 abgebildeten Opalinen zeigen eine Zelle, die in einer isotonischen Zuckerlösung violett wird, während die andere, Fig. 15, in isotonischer Natriumchloridlösung mit demselben Methylviolett blau wird. Fig. 16 stellt ein Paramäcium dar, welches in der isotonischen Natriumchloridmethylviolettlösung völlig blau wird, während sich in der isotonischen Zuckerlösung mit Methylviolett nur der nierenförmige Kern seiner physiologischen Mineralsäure wegen blau färbt und der Rest des lebenden Tieres farblos bleibt.

Wir haben hiermit die Bestätigung dessen erbracht, was wir bereits in unserer früheren Arbeit für Tierzellen bewiesen haben, nämlich, daß die schädliche Wirkung des Natriumchlorids auf das Protoplasma in der Bildung eines inneren, sauren Mediums beruht und in physikalischen Veränderungen der Eiweißkörper des Zellinhaltes.

Schutzwirkung der Carbonate gegen die Säurebildung durch Chloride.

Wir haben an Algen nicht direkte Versuche anstellen können wie an Opalinen[1]), da die Algen der stark kalkhaltigen Trinkwasser sich nicht dazu eignen. So fanden wir bei Cladophora ebenso wie bei Spirogyra, welche wir bereits 20 Tage in destilliertem Wasser hielten, das täglich 1 bis 2mal gewechselt wurde, noch einen ziemlich beträchtlichen Kalkgehalt des destillierten Wassers. Die Kalkinkrustation dieser Algen war vorher mikrochemisch festgestellt worden.

Unsere Versuche beziehen sich deshalb auf eine größere oder geringere Kalkreinheit der Algen und deren Reaktion mit Chloriden.

So sahen wir, daß die im März noch relativ kalkfreien Cladophora nach 10tägigem Aufenthalt in destilliertem Wasser die schädliche Wirkung der Chloride früher fühlten als die direkt dem Trinkwasser entnommenen und nur mit destilliertem Wasser gewaschenen Algen. Wir sahen auch, daß das Magnesiumchlorid ersteren Algen schädlicher als das Natriumchlorid war, während das Gegenteil bei den Algen aus der Acqua Marcia der Fall war.

---

[1]) l. c.

Außerdem findet die Bildung der sog. Proteosomen mit 2‰igem Natriumchlorid nur in den Algen statt, welche lange in destilliertem Wasser gelebt haben. Das ist wohl der Grund, weshalb die Autoren diese Niederschläge in Natriumchlorid nicht sahen und ihr Vorkommen ausschließen.

In jedem Falle ist jedoch in den Algen die Säurebildung weniger schädlich als in den roten Blutkörperchen und den Opalinen, da in ersteren stets in normaler Weise organische Säuren gebildet werden, während die Blutkörperchen in einem neutralen Milieu und die Opalinen in einem ausgesprochen alkalischen Medium leben. Deshalb müssen die Salze in den Algen mehr durch die Kationen als durch die Anionen wirken, und eine sehr geringe Menge von Alkalicarbonaten zur Neutralisierung der anorganischen Säure kann experimentell kaum merkbar günstig auf die Algen wirken, während das Gegenteil mit Calciumcarbonat der Fall ist, welches nicht nur neutralisierend wirkt, sondern zugleich seiner antagonistischen Eigenschaften wegen durch sein Kation die schädliche Wirkung des Natriums aufhebt.

Spezifische Eigenschaften der Versuchskationen.

Aus unseren Versuchen ergeben sich deutlich die verschiedenartigen Wirkungen der Chlorkationen in schwachen isoelektrischen Lösungen. Ihre schädliche Wirkung, welche direkt durch die Zahl der abgestorbenen Zellen in einem Algenfaden angezeigt wird, stuft sich folgendermaßen ab: $MgCl_2 < KCl < NaCl$, wenn die Wirkung nicht durch vorhandene Erdcarbonate verändert wird.

Die auffälligsten Wirkungen der drei Kationen sind folgende:

$MgCl_2$: Beginn der Proteosomenbildung in Spirogyra an einem der Quersepte, Zelluloseneubildung in Cladophora.

KCl: Auflösung der Chlorophyllkörner in beiden Algen; Bruch der Zellmembran an den Quersepten von Spirogyra.

NaCl: Verflüssigung des Protoplasten und Isolierung der Chlorophyllkörner bei Cladophora; Quellung der Spirale von Spirogyra.

Die konzentrierteren Natriumchloridlösungen von 2 bis 4% bewirken bei kurzer Einwirkung erst Schwellung und dann Lösung des Chlorophylls, wie wir das beim Kaliumchlorid in

schwacher Lösung, aber langer Einwirkung gefunden haben. — In den 3 und 4 %igen Lösungen tritt die Umwandlung des ganzen Zellinhaltes in Proteosomen unter äußerst heftiger Bewegung auf, wie wir das ebenfalls nach Aufenthalt von Spirogyra in schwacher Magnesiumchloridlösung, wenn auch in sehr geringem Maße, beobachteten.

Es scheint also, daß der Unterschied in der Wirkung der drei Kationen nicht im wesentlichen verschieden ist, sondern in der größeren oder geringeren Schnelligkeit und Heftigkeit ihres Auftretens besteht.

Es ist deshalb anzunehmen, daß es für ein jedes der drei Kationen eine bestimmte Konzentration gibt, in der sie in derselben Zeiteinheit dieselbe Wirkung auf das Protoplasma ausüben, wobei sie dann natürlich nicht untereinander isoelektrisch sein können.

Die drei Kationen können also, trotzdem zwei monovalent und eines bivalent ist, in bezug auf ihre biologische Wirkung als nahverwandt betrachtet werden, was der Loebschen Auffassung durchaus widerspricht.

Außerdem geht aus unseren Experimenten hervor, daß ein bedeutender Unterschied in der Wirkung der Chloride auf die Algen in Gegenwart von Erdcarbonaten auftritt, welche stets einen günstigen Einfluß ausüben und unter anderem das Auftreten der Proteosomen hindern.

Das erklärt den Unterschied zwischen unseren Beobachtungen und denen von Loew und Bokorny u. a., welche die Proteosomenbildung durch Neutralsalze leugnen. Nicht minder interessant ist die hemmende Wirkung des Calciumcarbonates auf die Deplasmolyse. Das beweist, daß die physikalische Wirkung durch die chemische Wirkung bedeutend abgeändert wird (Klebs, True Enriquez).

Über die Art des Eindringens der Salze in die Plasmahaut und das Protoplasma.

Unsere Untersuchungen beziehen sich nicht auf das Wesen der fast symbolischen Plasmahaut Pfeffers, und wir müssen es auch dahingestellt sein lassen, ob sie sich mit der Zanggerschen Auffassung einer „dünnen, zwei Flüssigkeitssysteme trennenden Schicht kolloidaler Art und weiterhin einem ko-

härenten, kontinuirlichen Kolloidhäutchen" gänzlich vereinbaren lassen.

Schon die Titel der mehr als 600 allein von Zangger zitierten Arbeiten beweisen, daß das eigentliche Wesen der Begrenzung der kolloidalen Protoplasmamasse nach außen hin noch nicht genügend erkannt ist. Wir begnügen uns deshalb damit unter Plasmahaut die Begrenzung dort, wo sie mit den die Zelle umgebenden Flüssigkeiten in Berührung tritt, zu verstehen.

Die modernen Hypothesen über die Konstitution der Plasmahaut sind im wesentlichen folgende drei: Nach der grundlegenden Pfefferschen Auffassung besteht die Plasmahaut zum größten Teil aus Eiweißkörpern, weil sie mit Quecksilberchlorid, Jod usw. gerinnt, und nach und nach durchlässig für sehr verdünnte Metallsalze wird, ohne anscheinend Kontinuitätsstörungen aufzuweisen.

Overton nimmt hingegen an, daß sie aus Substanzen besteht, welche sich ihrem Lösungsvermögen nach den Lipoiden nähern.

Nathanson vereinigt beide Auffassungen, indem er die Plasmahaut als eine Art Mosaik auffaßt, in welchem die Steinchen teils aus nicht hydrolisierbarem Cholesterin bestehen, und zum anderen Teil aus protoplasmatischem Material, welches die spezifischen Eigenschaften der semipermeabeln Traubeschen Membran besitzt.

Nach Overton treten die Körper nach den Gesetzen der auswählenden Löslichkeit in die Zelle. So gelangen die in Fetten löslichen Körper schneller und reichlicher als die in Wasser löslichen in die Zelle, und zwar mit wachsender Geschwindigkeit je nach ihrem Lösungsvermögen in Fetten. So dringen Glycerin, Mono- und Dichlorhydrin, Harnstoff und ihre Mono-, Di- und Trimethylderivate mit wachsender Geschwindigkeit in das Protoplasma, weil in beiden Reihen das Lösungsvermögen für Fette steigt. Und ebenso gelangen die freien Alkaloide, nicht aber deren Salze, in die Zelle, ferner Quecksilberchlorid, Jod, Osmiumsäure, Chloroform usw.

Aber diese Erklärung genügt nicht für alle in die Zelle gelangenden Körper, da die Mineralsalze, viele organische Salze und die sauren Amide nicht in Fetten löslich sind, ebensowenig wie gewisse basische Farbsalze, welche doch die lebende Zelle samt ihrer Plasmahaut färben. Daher suchte Overton

die Konstitution der Membran nicht durch einfache Fettsubstanz zu erklären, sondern durch Lipoide, d. h. durch ein Gemisch von Cholesterin, Lecithin, Protagon und Cerebrin, welche fähig sind, die vitalen Farben aus Lösungen von 1:50000 und von 1:200000 aufzunehmen, wenn sie in diesem suspendiert sind, wie sie dann auch von Olivenöl und Benzol gelöst werden. Damit steht aber die Tatsache in Widerspruch, daß gleichzeitig mit der Permeabilität für in Fett lösliche Körper auch besonders die Permeabilität für Wasser steigt. Deshalb nimmt Overton an[1]), daß die Plasmahaut nicht nur aus Cholesterin, sondern aus einer Verbindung von Cholesterin mit Lecithin oder Lanolin bestünde, welche außer den charakteristischen Eigenschaften des Cholesterins auch die Fähigkeit besitzt, Wasser aufzunehmen. Daher die Fähigkeit der Plasmahaut, nicht nur die in Fett löslichen Körper, sondern auch Wasser zu absorbieren. Dadurch jedoch wird die Tatsache nicht erklärt, daß Pflanzenzellen sich in einer 1 $^0/_0$ igen Lösung von Anilinblau nicht färben, obgleich dieses sowohl Cholesterin als mit Wasser angefeuchtetes Lanolin färbt; und unerklärlich bleibt auch der Eintritt von Mineralsalzen.

Die nicht völlig mit den Tatsachen zu vereinbarende Theorie Overtons wurde deshalb später von Nathanson weiter ausgebaut.

Höber[2]), welcher die Ansichten von vielen Autoren zusammenfaßt, teilt Overtons Anschauungen nicht, sondern nimmt an, daß die Salze der Schwermetalle, die Ätzalkalien und die Säuren, um in das Innere der Zelle zu dringen, die Plasmahaut und ihre Kolloide, darunter das Eiweiß, angreifen.

Am klarsten erscheint der Unterschied in der Auffassung beider nach Hoeber in der Hypothese Overtons in bezug auf die Wirkung der verschiedenen Kaliumsalze auf die Muskelkontraktionen. Overton schied diese Salze in zwei Gruppen: in der ersten vereinigte er die mit den Anionen Cl', Br', NO'_3 und I' und in der anderen die mit den Anionen PO_4H'', SO''_4, $C_2H_5SO'_4$, CH_3-COO' und CH_2OH-COO', denn, wenn auch alle diese Verbindungen die Reizbarkeit erhöhen, so nimmt doch

[1]) Vierteljahrsber. d. nat. f. Gesell. zu Zürich 44, 88, 1899.

[2]) Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe. Zweite Aufl. 1906, 259.

durch die erste Gruppe der Muskel schnell Wasser auf und geht dabei zugrunde, während die zweite Gruppe weder auf sein Volum noch auf seine Lebensfähigkeit einen besonderen Einfluß ausübt. Daher rührt die Annahme, daß die Salze der zweiten Gruppe nicht durch die Plasmahaut der Muskelfasern durchgehen und daß die Kaliumionen sich nur in letzterer lokalisieren. Dagegen treten die Salze der ersten Gruppe als Moleküle hindurch.

Höber sieht hierin chemische Vorgänge zwischen Salzen und Kolloiden, da alle Salze als Moleküle durch die Plasmahaut treten und anzunehmen ist, daß sich hier Vorgänge abspielen, wie sie Hoffmeister und Pauli an Gelatine beobachtet haben, welche sich unter der Wirkung der Chloride, Bromide, Nitrate und Alkalijodide auflöst und unter Einwirkung der Sulfate, Citrate, Tartrate und Acetate härtet. Deshalb soll die Plasmahaut nicht aus Lipoiden, sondern aus zwei Kolloiden bestehen, von denen das eine durch seine Veränderung die Phänomene der Reizbarkeit hervorbringt, während das andere der Haut eine gewisse Konsistenz verleiht, welche ihr die Impermeabilität sichert. Wir hätten es demnach nicht mit einer Lipoidmembran zu tun, sondern mit einer, die aus zwei Eiweißkörpern besteht, nicht mehr mit auswählender Löslichkeit, sondern mit chemischen Affinitäten und mit einer Impermeabilität der Haut für Salze als Ausdruck des physikalisch-chemischen Gleichgewichts der mehr oder weniger löslichen Verbindungen von Salzen mit Eiweißkörpern. Danach wäre die Permeabilität der Plasmahaut ein anormaler Zustand, der Ausdruck also eines gestörten Gleichgewichts in ihrer Beschaffenheit.

Und das ist sicher der Fall, wenn die Zellen der Wirkung eines einzigen Salzes oder großen Mengen eines Gemisches unterworfen werden, in dem sie mehr oder weniger schnell zugrunde gehen. Aber im Falle des normalen Stoffwechsels kann die Permeabilität nur eine physiologische Tatsache sein, und die vergiftende Salzmenge darf nicht mit der physiologischen verwechselt werden. Höber nähert sich mit seiner Anschauung Pfeffer, welcher die Permeabilität der Haut abhängig von einer mehr oder weniger großen Alteration oder Gerinnung macht.

Uns scheint die Annahme von chemischen Verbindungen zwischen Salzen und Plasmahaut während des normalen Stoff-

wechsels wahrscheinlicher, wie wir auch auf Grund unserer Beobachtungen folgern müssen, daß die Plasmahaut weder chemisch homogen noch eine Art gleichförmiges Mosaik sein kann, wenn, wie wir annehmen müssen, der Stoffwechsel nicht gleichmäßig an der ganzen Oberfläche stattfindet. Daß zwischen der Plasmahaut der Pflanzen und Tierzellen Unterschiede bestehen, hat bereits Overton festgestellt. Daß die Plasmahaut nicht in allen Organen desselben Körpers identisch ist, ist ebenfalls bekannt, da z. B. gewisse Vitalfärbungen nicht an allen Zellen und Organen gelingen. Daß Farbstoff bei Opalinen nur vom hinteren Ende dieses einzelligen Tieres aufgenommen wird, fand einer von uns bereits im Jahre 1896 und schloß aus seinen Beobachtungen an diesen und anderen im Wasser lebenden Organismen, daß das Leben einer an der ganzen Oberfläche durchlässigen Zelle überhaupt unmöglich sei.

Um die Hypothese einer Lipoidmembran den widersprechenden Tatsachen anzupassen, wurde eben das Vorkommen von verschiedenen Lecithinen und Cholesterinen mit verschiedenen Eigenschaften und ihre Mischung oder Verbindung in verschiedenen Mengen mit anderen Körpern angenommen.

Anstatt dessen haben wir gesehen, daß die mit der Zelle in Berührung kommenden Lösungen stets an bestimmten Stellen in diese eindringen; es muß also logischerweise vorausgesetzt werden, daß dort die chemische Zusammensetzung eine andere ist.

Wir wissen auch, daß die Drüsenzellen „ein spezifisches Sekretionsvermögen besitzen, welches nicht mit den osmotischen Vorgängen zu identifizieren ist, und in denen die durchlässige Zellhaut passiv bleibt“[1]), und daß „der Zucker aus den Drüsen nicht ausgeschieden wird, nicht etwa weil sie für ihn impermeabel sind, sondern weil ihnen dies Sekretionsvermögen fehlt“[2]), welches z. B. die Nektarien besitzen.

Mit anderen Worten bedeutet das, daß in diesen Zellen die Plasmahaut eine derartige Zusammensetzung hat, daß sie mit Zucker keine Verbindungen eingehen kann, welche sie für diesen permeabel machen, um ihn dann durch die Labilität dieser Verbindungen oder auch durch ihr hochgradiges Abspaltungsvermögen wieder auszuscheiden.

---

[1]) Asher, diese Zeitschr. 14, 26, 1908.

[2]) Asher, diese Zeitschr. 14, 121, 1908.

Es scheint uns deshalb wahrscheinlich, daß die Plasmahaut dieselbe Zusammensetzung besitzt, wie die Protoplasmamasse nach der Hypothese von Pfeffer, und ebensowenig wie letztere als chemisch homogen aufgefaßt werden kann. Daher die auswählende Löslichkeit, die auf einzelne Stellen der Oberfläche beschränkt ist. Wir müssen deshalb an dieser die Eiweißkörper allein und auch in Verbindung mit Lipoiden finden, wodurch sich das Eindringen verschiedener Stoffe erklärt und in gewissen Fällen die sofortige Bildung einer neuen Haut, ohne daß die Zelle eine besondere Arbeit behufs Wiederherstellung und Auswahl verrichtet.

Daß sich auf diese Weise die Wirkungen erklären, welche die verschiedenen Salze auf die Plasmahaut ausüben[1]), zeigen die Resultate unserer letzten Arbeit, die wir hier bereits zusammenfassen, nämlich, daß die Salze der Alkalimetalle, der alkalischen Erden und Schwermetalle Verbindungen mit den Eiweißkörpern eingehen, indem sie metallsaure Proteide bilden, in denen sich das Kation und das Anion in derselben stöchiometrischen Menge wie im freien Salze befinden. Diese Tatsachen müssen die sehr verbreitete Auffassung einer festen und auch auswählenden Lösung verändern. Uns wenigstens scheint es logischer, in diesem Falle anstatt der festen Lösung eine chemische Verbindung anzunehmen.

Im übrigen sind wir natürlich überzeugt, daß bei dem Stoffwechsel nicht nur chemische, sondern auch physikalische Vorgänge in Betracht kommen, und zwar so, daß die anorganischen Salze in Berührung mit der Plasmahaut sich mit den Eiweißkörpern der letzteren verbinden und deren physikalische Eigenschaften wenig, mäßig oder stark abändern, je nachdem die Salzmenge der Lösung gering, mäßig oder groß ist, d. h. je nachdem die Salze in demselben Maße wie in den physiologischen Nährflüssigkeiten enthalten sind, in isotonischen oder hypotonischen Lösungen, da, wie bekannt, die Salze in allen Konzentrationen in die Zellen eintreten[2]) und zwar mit einer Geschwindigkeit, welche direkt von der Menge des in Lösung

[1]) Wir lassen hier die Narcotica und diejenigen anderen Körper unberührt, deren Eintritt sich mit der Overtonschen Hypothese von den Lipoiden in der Plasmahaut erklären läßt.

[2]) Rysselberghe l. c. 100.

befindlichen Salzes abhängt.[1]) Wir dürfen deshalb voraussetzen, daß die Protoplasmahaut und das Protoplasma diese Körper speichern, und zwar nicht einer elektiven Löslichkeit wegen, sondern abhängig von dem äußerst geringen Abspaltungsgrad der sich bildenden metallsauren Proteide im Gegensatze zu dem großen der Salze. So wissen wir z. B., daß es trotz aller Mühe nicht gelingt, eine Pseudolösung durch Dialyse mit einer für die Micellen undurchlässigen Membran von den Salzen zu befreien, da kleine Mengen Elektrolyte zurückbleiben, welche auch durch lange fortgesetzte Dialyse nicht entfernt werden können, wenn es nicht bis zur Ausflockung der Pseudolösung kommt, was ja beweist, daß der Elektrolyt nicht nur in der intermicellären Flüssigkeit vorhanden ist, sondern auch teilweise von den Micellen selbst absorbiert und festgehalten wird. Es ist auch bekannt, daß, wenn zu einer Pseudolösung eine zu geringe Salzmenge gefügt wird, um sie zu fällen, ihr Leitungsvermögen nicht der hinzugefügten Salzmenge entspricht, sondern geringer ist. Daher die Vermutung, daß ein Teil derselben sich mit den Micellen verbunden hat. Deshalb muß ihre chemische Zusammensetzung wie eine fortdauernde Funktion der intermicellaren Flüssigkeit aufgefaßt werden, zu welcher nichts hinzugefügt werden kann, ohne daß die Micellen ihren Teil davon nehmen[2]) (Ducleaux). Diese Tatsache war bereits Stange bekannt und wurde dann von Nathanson vollständig bestätigt. Dasselbe ist von den Speicheldrüsen bekannt, in denen Kollektoren von Chlorionen oder besser von Chloriden[3]) vorhanden sein sollen, d. h. von Eiweißkörpern, welche mit den Chloriden sehr wenig abspaltbare Verbindungen eingehen.

Aber andere Tatsachen beweisen, daß die Eiweißkörper nicht nur ziemlich stabile Verbindungen mit der geringsten Elektrolytenmenge eingehen können, sondern auch labile Verbindungen mit der größten Elektrolytenmenge, von welcher diese sich mit um so größerer Leichtigkeit losreißt, je höher der Kombinationsgrad ist.

So wird, wie wir bereits sagten, ein löslicher 1%-Niederschlag von Eiereiweiß erhalten, wenn der Lösung Kupfersulfat

[1]) Rysselberghe l. c.

[2]) Deuxième supplém. au Dictionn. de Chimie de Wurtz.

[3]) Asher, diese Zeitschr. 14, 28, 1908.

zugesetzt wird, welcher sich dann in einem Überschuß von Kupfersulfat wieder vollständig löst und bei erneutem Eiweißzusatz wieder ausfällt.

Das erklärt sich nur mit der Annahme, daß der Lösung des Niederschlags eine weitere Verbindung der Sulfatmolekel mit den Eiweißmolekeln entspricht, oder aber der Bildung einer saueren und löslicheren Verbindung, welche dann zurückgeht und durch nochmaligen Zusatz von Eiweiß ausfällt. Außerdem werden gewisse Eiweißkörper aus Pseudolösungen durch folgende Salze gefällt: Natriumsulfat, Chlornatrium, Ammoniumchlorid, Ammoniumsulfat usw., aber nur wenn die Lösung einen sehr hohen Grad erreicht hat, durch welchen eine höhere Verbindung möglich wird, welche unter diesen Bedingungen nicht oder nur sehr wenig abspaltbar ist und nicht in Lösung bleiben kann und, sowie die Konzentration der Lösung abnimmt, verschwindet, da sie sich dann wieder abspaltet.

Schließlich kann die Bildung von höheren Verbindungen durch die von Bonamartini beobachtete Tatsache bewiesen werden[1]), daß das Myoalbumin, welches normalerweise bei 42° gerinnt, durch Zusatz von $ClNa$, $ClNH_4$, $SO_4(NH_4)_2$ und SO_4Mg bei immer niedrigeren Temperaturen gerinnt, je nach der Qualität und Quantität des zugesetzten Salzes. Die Wirkung der Salze ist um so schneller, je größer ihr Dissoziationsgrad, d. h. je größer ihre Kombinationsfähigkeit ist. Und da auch dieser Vorgang mathematischen Gesetzen unterliegt, welche mit dem bekannten Adsorptionsgesetze zusammenfallen[2]), kann man nicht ausschließen, daß es sich hier um chemische Verbindungen zwischen Salzen und Myoalbumin handelt. Wenn sich das nicht so verhielte, könnte das von Freundlich gefundene Gesetz, daß „die Adsorption eines in Lösung befindlichen Körpers stets stattfindet, wenn die Oberflächenspannung geringer als die der Flüssigkeit wird" keine Ausnahmen erleiden, und es könnte keine Elektivität seitens des Adsorbenten stattfinden, wie es in Wirklichkeit geschieht. So verhalten sich nach Michaelis und Ehrenreich[3]) die einzelnen Fermente ganz verschieden gegen

[1]) Gazzetta chimica italiana 37, parte IIa, 1907.

[2]) Wolfgang Ostwald, Zeitschr. f. Chem. und Industr. d. Koll. 2, 108 u. 138, 1907.

[3]) Diese Zeitschr. 10, 283, 1908.

die Adsorbenten, und die Autoren glauben deshalb, daß die Adsorption, außer von den oben angeführten physikalischen Gesetzen auch von anderen Umständen abhängt.

Wir nehmen deshalb an, daß in diesen Vorgängen, welche bisher zu ausschließlich vom rein physikalischen Standpunkte aus betrachtet wurden, die chemischen Vorgänge nicht ausgeschlossen werden können, besonders auch, weil die Ionen daran teilnehmen und weil, wenn zwischen dem adsorbierenden und dem adsorbierten Körper sich nur physikalische Vorgänge abspielten, unter veränderten Bedingungen die aufgetretenen Wirkungen verschwinden müßten. So müßten die mit den Salzen gebildeten Niederschläge verschwinden, wenn das Mittel, in dem sie sich bildeten, modifiziert würde, was nur bei den Alkalimetallen stattfindet, nicht aber bei den Schwermetallen, welche die adsorbierten Körper festhalten, wie einer von uns[1]) auch nach zahlreichen Waschungen mit destilliertem Wasser bei dem Labenzym beweisen konnte.

Diese Verbindungen der Eiweißkörper mit den verschiedenen Salzen werden, wie man wohl sagen kann, durch ihr Verhalten zu der Regelmäßigkeit oder Unregelmäßigkeit der Lebensfunktionen charakterisiert, d. h. durch ihre Schädlichkeit oder Unschädlichkeit, durch ihre Labilität oder mehr oder minder große Stabilität, durch ihren kleineren oder größeren Verbindungsgrad, welchem eine unaufhörliche Veränderung der physikalischen Eigenschaften folgt. Deshalb muß der Transport der anorganischen Nährkörper im Organismus oder in einzelnen Zellen durch höhere labile oder leicht abspaltbare Verbindungen erfolgen, welche mit Leichtigkeit einen Teil ihres Salzes an die im Inneren der Zelle befindlichen Eiweißkörper unter dem Druck oder dem Einfluß des im flüssigen Mittel gelösten Salzes abgeben.

Auf diese Art kann die Schnelligkeit der Permeation durch die Konzentration und auch durch die Temperatur erklärt werden, da die erstere die Bildung der höheren Salzverbindungen begünstigt und die andere die Reaktion beschleunigt. Auf diese Weise läßt sich auch die beständige Abnahme der Salzausscheidung aus dem Fischkörper erklären, wenn die Fische aus Leitungs-

---

[1]) Scala, Stazioni sperim. agraric. ital. 36, 941, 1903.

wasser in destilliertes Wasser übergeführt werden. Diese Abnahme erreicht einen bestimmten Grenzwert, welcher den niedrigsten abspaltbaren Verbindungen der Eiweißkörper entspricht, die das Aufhören des Stoffwechsels bedeuten. Und so erklärt sich auch der Durchgang der Schwermetallsalze durch Eiweiß- und Kolloidhäute. So geht Kupfersulfat nur in konzentrierter Lösung durch Schweinsblase, d. h. wenn die Bildung von hohen Verbindungen möglich ist.[1]) Die Haut der Wirbeltiere, welche gewöhnlich nur bis zum Stratum granulosum durchlässig ist, wird es für Jod, welches mit den verschiedenen Eiweißkörpern unlösliche Verbindungen eingeht, wenn die Lösung auf die Oberfläche aufgetragen wird und sich natürlich durch sofortige Verdampfung konzentriert, mit den äußeren Hautschichten hohe Verbindungen eingeht; es muß ausgeschlossen werden, daß die äußeren Hautschichten für Jod im osmotischen Sinne durchlässig seien[2]), wie auch in diesem Sinne die Plasmahäute aller Zellen nicht völlig durchgängig für Natriumchlorid sind, welches nach Höber[3]) und Henriquez[4]) Verbindungen mit den Eiweißkörpern eingeht. In diesem Sinne ist auch eine Tatsache zu erklären, deren Bedeutung nicht verkannt werden kann, nämlich, daß die Eiweiß- oder Kolloidmembranen durchdringlich für Salze sind und semipermeabel werden, wenn sie mit einer Schicht überzogen werden, welche mit keinem Salze Verbindungen eingeht, oder aber, wenn das Kolloid vor der Berührung mit den Salzen geschützt wird.

Auf diese Weise wird es möglich, die Ernährungsweise der Zellen und der verschiedensten lebenden Organismen zu erklären, auch infolge von diastatischen Wirkungen, welche in allen vitalen und Ernährungsphänomenen eine außerordentliche Wichtigkeit besitzen, Wirkungen, welche sich mit Hilfe von anorganischen Salzen mit verschiedenen Anionen und Kationen vollziehen.[5]) Denn die Eiweißkörper und Kolloidkörper ändern, indem sie

---

[1]) Höber, Opera citata 1903, 101 e seg..

[2]) Margherita Traube Mengarini, Osservazioni ed esper. sulla permeabilità della pelle. Rendiconti d. R. Acad. d. Lincei, 7, 171, 1891; 5, 14, 1896.

[3]) Opera citata 1903, 101.

[4]) Rendic. Acad. Lincei, 11, 495, 1906.

[5]) Scala, Annali d'Igiene 1907. — Abderhalden und Teruuchi, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 1, 1906.

sich mit anorganischen Salzen verbinden, je nach Bedürfnis ihren Zustand, indem sie flüssiger oder fester werden, je nachdem die Stoffe aufgenommen oder fortgeschafft werden sollen, welches beides in dem unaufhörlichen und stürmischen Bewegen des Lebens durch die außerordentliche Leichtigkeit bewirkt wird, mit der diese Verbindungen sich bilden und wieder auflösen.

Wir wissen aus den Experimenten Matthews[1]) und Overtons[2]), daß sowohl die Muskeln wie die Nerven für die Reizwirkungen des Natriumions bedürfen und daß alle mehrwertigen koagulierenden Kationen die Reizbarkeit erhöhen, während die einwertigen Kationen sie mehr oder minder, je nach ihren Anionen, erhalten. Das beweist, daß die mit der Reizbarkeit in Beziehung stehenden Prozesse abhängig von dem Zustande der Kolloide sind, oder vielmehr von einem bestimmten Quellungszustand, da die Reizbarkeit mit ihrer Verflüssigung abnimmt.[3]) Es war übrigens bereits seit geraumer Zeit festgestellt, daß die Eiweißkörper sich in einigen Salzen lösen und durch andere ihre Verflüssigung abnimmt. Legumin und alle Globuline lösen sich völlig in NaCl und NH_4Cl und anderen Salzlösungen; die Wimpern der Larven von Arenicola werden in allen Natrium- und Lithiumsalzlösungen sofort unbeweglich und lösen sich auf.[4]) Die Opalinen quellen in isotonischen Natriumchloridlösungen und zerfließen.[5]) Die Retention des Kochsalzes im Organismus vergrößert die Blutmasse und den Druck; wenn keine Diurese erfolgt, geht das Salz in die Gewebe über und der Druck fällt, aber dadurch werden die Gewebe hydratisiert und ödematös.

Andererseits wissen wir, daß unter gewissen Bedingungen das Legumin durch Kalksalze unlöslich wird und die Wimpern der Larve von Arenicola sehr wenig durch die Salze von Ca, Sr, Ba, Mg und Mn beeinflußt werden. Die Kupfer-, Zink-, Blei-, Aluminium-, Chrom- und Eisensalze heben im allgemeinen

---

[1]) Science 15, 492, 1902.

[2]) Verhdl. d. Ges. Deutsch. Naturf. u. Ärzte 2, 416, 1903.

[3]) Höber, Centralbl. f. Physiol. 19, 390, 1905.

[4]) Lillie, Amer. Journ. of Physiol. 10, 419, 1904.

[5]) Margherita Traube Mengarini e Scala, Archivio di fisiologia 4, 609, 1907.

durch Gerinnung der Eiweißkörper und Vergiftung das Leben auf und halten die Wimperbewegung an. Diese Verschiedenartigkeit in der Wirkung der anorganischen Salze auf die Eiweißkörper zeigt sich auch in den von uns ausgeführten Viscositätsbestimmungen, indem wir eine Lösung von Eiereiweiß mit dem gleichen Volum von NaCl, KCl, $MgCl_2$ und $CaCl_2$ behandelten. Diese Bestimmungen wurden mit dem Viscosimeter von Ostwald bei einer Temperatur von 35° angestellt, und die Resultate ergeben sich aus folgender Tabelle:

	Zu 10 ccm der Lösung zugesetzte Substanzen	Zeitdauer des Ablaufens min. III	Viscosität $\frac{T}{T_{H_2O}}$
Destilliert. Wasser	—	5408	1,000
Lös. v. Eieralbumin	Dest. Wasser ccm 1	5178	1,5193
„ „ „	Lös. N/NaCl „ 1	5124	1,5035
„ „ „	„ N/KCl „ 1	5040	1,4788
„ „ „	„ N/$MgCl_2$ „ 1	5178	1,5193
„ „ „	„ N/$CaCl_2$ „ 1	5160	1,5140

Hieraus ergibt sich, daß Natriumchlorid und mehr noch Kaliumchlorid die Viscosität der Eiweißlösung vermindern und diese in einen Zustand der annähernd völligen Lösbarkeit überführen, während Magnesiumchlorid und Calciumchlorid im Gegenteil die Viscosität der Eiweißkörper erhalten und vielleicht unter Zusatz von größeren Salzmengen und bei verschiedenen Eiweißkörpern vermehren.

Da nun jedes Protoplasma zur Ausübung seiner verschiedenen Funktionen, d. h. zum Leben, sich u. a. in einem bestimmten Konsistenzgrade erhalten muß, und da auch gewisse von chemischen Reaktionen abhängige Funktionen nicht ohne bestimmte Metalle stattfinden, ergibt sich von selbst die Folgerung, daß zum Leben verschiedene Salze mit verschiedenen Anionen und verschiedenen Kationen nötig sind, und zwar in einem Verhältnis, welches ein zweckmäßiges Gleichgewicht der physikalischen Eigenschaften ermöglicht und ein Optimum in der Verwendung der chemischen Reaktionen. So haben die anorganischen Salze dieselbe Nährwichtigkeit wie die stickstoffhaltigen und die Kohlenhydrate. Der Mangel oder allzu großer Überschuß eines der gewöhnlichen Nährsalze führen unvermeidlicherweise zu Störungen, welche von den höheren Organismen

mehr oder minder gut vertragen werden, in den niederen Organismen aber augenfälligere Störungen und auch den Tod herbeiführen.

Diese Wirkungen hängen nicht ausschließlich von den Kationen, sondern auch von den Anionen ab, da die Salze als vollständige, wenn auch ionisierte Molekel in die Zellen eindringen und nicht als Ionen allein (Rysselberghe und Stange). Wie die Kationen so haben auch die Anionen in diesen Wirkungen einen spezifischen Wert. Nach Beneke ist Cl' weniger schädlich als SO_4'', NO_3' und PO_4'''; nach Overton begünstigen die Anionen die Lösung der Kolloide in folgender Ordnung: $CNS < I < NO_3 < Br < Cl$, wie in der absteigenden Serie von Hoffmeister, Pauli und Posternak, und die Kaliumsalze wirken je nach ihrem Anion verschieden, d. h. also mit anderen Worten, daß die Anionen zu den Verbindungen mit den Eiweißkörpern in einer Weise beitragen, welche bis jetzt noch nicht aufgeklärt ist. In jedem Falle ist die Verschiedenheit der physikalischen Eigenschaften der metallsauren Proteide, welche sich mit den verschiedenen Salzen bilden, augenscheinlich; Eigenschaften, welche in zweierlei Weise verändert werden können: entweder durch Ausschaltung der saueren Kette vermittels Neutralisierung mit Alkalien und gleichzeitiger Überführung in einen festeren Zustand oder durch die Einwirkung metallsaurer Proteide mit antagonistischen Eigenschaften.

Der erste Fall ist auf die Lebewesen oder Zellen anwendbar, welche in einem alkalischen oder einem neutralen Medium leben, wie die Opalinen und die roten Blutkörperchen, von denen die Säure, sei sie organischer oder anorganischer Natur, nicht vertragen wird; der zweite Fall ist auf die Lebewesen und Zellen anwendbar, welche eine starke organische Säure vertragen oder auch einen geringen Grad von anorganischer Säure, welche jedoch auf die Länge der Zeit stets schädlich wirkt.

Die schädliche Wirkung, welche destilliertes Wasser schließlich auf Algenzellen ausübt, kann nur dem gestörten physikalischen Gleichgewicht zugeschrieben werden, d. h. der Auswaschung des Calciums in der Form von wenig dissoziiertem Phosphat und mithin der Entziehung eines Metalles, welches der Verflüssigung der Eiweißkörper entgegenwirkt. Tatsächlich treten die beginnenden Störungen, wie oben beschrieben, als korro-

dierende Verflüssigung der Protoplaste an der Peripherie auf, wo die physikalisch-chemische Gleichgewichtsstörung ihren Anfang nimmt.

Ergebnisse unserer Versuche.

Aus unseren Versuchen an Cladophora und Spirogyra geht folgendes hervor:

1. Die Schädlichkeit des Natriumchlorids in 0,7 % Lösung in reinem destillierten Wasser und der mit dieser isoelektrischen Lösungen von Kaliumchlorid und Magnesiumchlorid nimmt vom Natriumchlorid zum Magnesiumchlorid zu, während in ebensolchen Lösungen, welche sehr geringe Menge von Erdcarbonaten enthalten, die Schädlichkeit in folgender Reihe zunimmt: $MgCl_2 < NaCl < KCl$.

2. In den Lösungen in reinem destillierten Wasser zeigt sich der verschiedene Charakter der Kationen folgendermaßen:

NaCl: Disorganisation des Protoplasmas und Verflüssigung desselben.

KCl: Auflösung der Chlorophyllkörner und Brüchigkeit der Zellmembran an den Quersepten.

$MgCl_2$: Beginnende Proteosomenbildung und Zelluloseneubildung an den Quersepten.

3. Bei konzentrierten (2—4 %) Natriumchloridlösungen mit reinem destillierten Wasser treten ungefähr dieselben Phänomene nach einer halben Stunde auf, die in schwachen (0,7 %) Kalium- und Magnesiumchloridlösungen nach mehreren Tagen auftreten, und die lebenden Zellen des Algenfadens füllen sich mit heftig bewegten Proteosomen. Außerdem tritt im Zellinneren eine starke Bildung von Mineralsäure ein, wie die Bläuung von Methylviolett beweist, welches sich hier ebenso verhält, wie unter Einwirkung von 0,7 % Natriumchloridlösung in Opalina und Paramaecium.

4. Die Salze dringen nicht von der ganzen Oberfläche her in die Algenzellen ein, sondern von den Quersepten, da die Korrosion des Protoplasmas, die Proteosomenbildung und die Celluloseneubildung und der Eintritt des Eosins an den Quersepten beginnt und ebendort das Eosin zuerst in der Zelle sichtbar wird. Dieselbe lokalisierte Permeabilität wird bei Opalina beobachtet, welche in isotonischer Natriumchloridlösung wie im

destillierten Wasser zuerst am hinteren Ende anschwillt und sich auflöst, während das vordere Ende sich wenig verändert und sogar sein Wimperspiel noch andauert. Auch das Eosin dringt vom hinteren Ende ein.

Schlußfolgerungen.

Die Ergebnisse unserer Versuche bestätigen die Annahmen derjenigen Autoren, welche das Eindringen der Salze als chemische Reaktion und nicht als osmotischen Vorgang auffassen. Nur damit können wir die von uns beobachtete elektive Permeabilität erklären. Ebenso spricht dafür, daß die Alkalichloride das Protoplasma disorganisieren, indem sie es verflüssigen und mineralsauer machen.

Diese Reaktionen sind mehr oder weniger stark, je nach der in Lösung enthaltenen Salzmenge und des Dissoziationsgrades des Salzes. Die physikalischen Eigenschaften der entsprechenden Verbindungen sind verschieden und absolut abhängig von der Menge des gebundenen Salzes. In derselben Weise wie gewisse isolierte Eiweißkörper durch geringe Mengen eines Alkalisalzes in Lösung übergehen, werden sie durch größere Salzmengen gefällt. Die physikalischen Eigenschaften dieser Lösungen wechseln nicht nur für verschiedene Mengen desselben Salzes, sondern unter sonst gleichen Bedingungen von Salz zu Salz mit verschiedenem Anion oder Kation, und diese Verschiedenheiten können derartig sein, daß sie geradezu einander entgegengesetzt sind.

Deshalb kann ein Salz allein das Leben des Protoplasmas nicht erhalten, da diesem entweder die Konsistenz verloren ginge oder die geeigneten physikalischen Eigenschaften, um die verschiedenen Funktionen auszuüben, wozu eben ein Gemisch von Salzen mit verschiedenen Anionen und Kationen nötig ist.

Daher kann das Protoplasma auf die Länge der Zeit die Entziehung von Salzen durch destilliertes Wasser nicht ertragen. So beobachteten wir an den Algen nach einer gewissen Zeit eine wahre Korrosion des Protoplasten, d. h. eine peripherische Verflüssigung, welche wahrscheinlich durch den Austritt des Kalkes bewirkt wird, welcher in das Wasser hauptsächlich in Form von Phosphat oder einem wenig dissoziierten Salz übergeht, wie wir es an den in destilliertem Wasser lebenden Fischen gesehen haben.

So erklärt sich die physikalische Gleichgewichtsstörung durch die Ausscheidung eines Kations und eines Anions, welche den Eiweißkörpern Konsistenz verleihen, und deren Schwinden das Übergewicht derjenigen Kationen und Anionen herbeiführt, welche die Verflüssigung der Eiweißkörper herbeiführen.

Es erklärt sich auch die schädliche Wirkung, welche durch den Überschuß eines an sich nicht schädlichen Salzes bewirkt wird dadurch, daß es die physikalischen Eigenschaften in einem oder dem anderen Sinne so ändert, daß die Lebenserscheinungen gehemmt oder auch aufgehoben werden.

Über die Verbindungsform zwischen Salzen und Eiweißkörpern haben wir ausführlich im Beginn dieser Arbeit bei dem Natriumchlorid gesprochen. Wir nehmen an, daß das Kation des dissoziierten Salzes ein Wasserstoffatom einer Aminogruppe in dem Eiweißmolekül ersetzt und das Anion sich mit diesem Wasserstoffatom zu einer Säure verbindet, welche nicht frei bleibt, sondern sich mit einer anderen Aminogruppe desselben Moleküls verbindet. So entsteht ein natriumsaures Proteid, welches ziemlich löslich in Wasser ist und in ein weniger lösliches Natriumproteid durch kaustisches Alkali oder irgend ein Carbonat verwandelt werden kann. Es kann also die allzu große Verflüssigung und die Bildung anorganischer Säure, welche, wie wir gezeigt haben, in einigen Fällen außerordentlich schädlich werden kann, dadurch aufgehoben werden, daß das natriumsaure Proteid in Natriumproteid verwandelt wird, oder aber, wie wir ebenfalls ausführten, durch die antagonistischen Eigenschaften anderer metallsaurer Proteide mit verschiedenen Anionen und Kationen.

Die anorganischen Salze verbinden sich also mit den Eiweißkörpern zu komplexen Verbindungen, in denen die Zahl der Salzmoleküle, welche sich mit demselben Proteinmolekül verbinden, mehr oder weniger groß ist und in denen der Abspaltungsgrad gleichen Schritt mit dem Kombinationsgrad hält.

Ist dann der höchste Kombinationsgrad erreicht, so tritt ein Teil des Salzes in die inneren Eiweißkörper der Zelle über und geht mit ihnen den geringsten, wenig abspaltbaren Kombinationsgrad ein, welcher nach und nach steigt, bis der Gleichgewichtszustand erreicht wird, falls im äußeren Medium kein überschüssiges Salz mehr vorhanden ist. Wenn aber im äußeren Medium noch Salze vor-

handen sind, so stellen diese augenblicklich die Salzverbindungen wieder her, welche einen Teil ihres Salzes an die im Innern der Zelle gelegenen Proteinkörper abgegeben hatten. Der Prozeß erreicht so die fernsten Teile des mehrzelligen Organismus.

Mit dieser Annahme erklärt sich auch die einseitige Permeabilität; denn wenn die Salze einmal in die Zelle oder die Zellen eingetreten sind und die Salze im äußeren Medium erschöpft sind, so schreitet die Salzverteilung nach innen zu und bis zu einem Kombinationsgrad fort, welcher nicht mehr maximal ist und unter Umständen bis zum Minimum zurückgeht, je nach den Salzmengen, die durch die nach innen gelegenen Zellteile oder Zellen des Organismus den äußeren entzogen werden. Deshalb kann von den im destillierten Wasser lebenden Fischen nur so viel Salz in dieses übergehen, als der Abspaltungsgrad der Eiweißverbindungen zuläßt. Und in der Tat ist von unseren Leuciscus in das destillierte Wasser täglich eine ungefähr konstante Menge anorganischer Körper übergegangen, wenigstens während zehn Tagen, um dann auf ein Minimum zu sinken, auf welchem sie sich erhielt, obgleich noch in den Fischen ein reichliches Material von anorganischer Substanz angehäuft war, wie wir aus der Aschensubstanz der Muskeln sahen.

Unsere Annahme, welche sich auf biologische, chemische und physikalische Daten gleichzeitig gründet, zeigt einen Weg zur Erklärung von vielen anderen Tatsachen, von denen wir hier nur auf zwei hinweisen: auf die Wasserwanderung von Zelle zu Zelle durch den ganzen Organismus (einen bei Pflanzen, besonders bei hohen Bäumen bisher unaufgeklärten Vorgang) und auf den kolloidalen Zustand verschiedener Körper.

Erklärung der Abbildungen.

Fig. 1. Cladophora nach 10tägigem Aufenthalt in dest. Wasser. *a* gesunde Zellen, *b* erschöpfte Zellen nach Eosinfärbung.

Fig. 2. Cladophora nach 10tägigem Aufenthalt in einer 0,7 %igen Lösung von ClNa.

Fig. 3. Ebenso in 0,7 isoelektrischer Lösung von ClK nach 9 Tagen.

Fig. 4. Ebenso in Cl_2Mg nach Eosinfärbung, *a* und *b* Celluloseneubildung nach 7 Tagen.

Fig. 5. Ebenso in ClNa nach Eosinfärbung.

Fig. 6. Ebenso in Cl_2Mg nach 9 Tagen. *a* Neubildung von Cellulose.

Fig. 7. Spirogyra nach 2tägigem Aufenthalt in 0,7 %iger ClNa-Lösung.

Fig. 8. Ebenso in isoelektrischer Lösung von ClK.

Fig. 9. Ebenso nach 60 Stunden.

Fig. 10. Ebenso nach 2tägigem Aufenthalt in isoelektrischer Lösung von Cl_2Mg. a) Proteosomenbildung.

Fig. 11. Cladophora nach 15tägigem Aufenthalt in dest. Wasser. Eosinfärbung. *a* Neubildung von Zellhäuten. Eindringen des Eosins und Zerstörung des Protoplasmas an den Quersepten.

Fig. 12. Ebenso nach 20 Tagen.

Fig. 13. Spirogyra in 3 %iger ClNa-Lösung. Während der Deplasmolyse ungewöhnlich früher Beginn der Proteosomenbildung.

Fig. 14. Opalina in isotonischer Zuckerlösung und Methylviolett.

Fig. 15. Opalina in isotonischer ClNa-Lösung mit Methylviolett.

Fig. 16. Paramaecium in isotonischer ClNa-Lösung mit Methylviolett. Saure Reaktion des ganzen Protoplasten.

Fig. 17. Spirogyra in 3 %iger ClNa-Lösung mit Methylviolett. *a* tote Zelle, *b* anstoßende lebende Zelle mit saurer Reaktion.

Fig. 18. Photographie von Spirogyra nach 7stündigem Aufenthalt in 1 %iger Coffeinlösung. Die hellen Zellenden unverändert, die dunklen vollgestopft mit Proteosomen in heftiger Bewegung. Differenzierung der Quersepten.

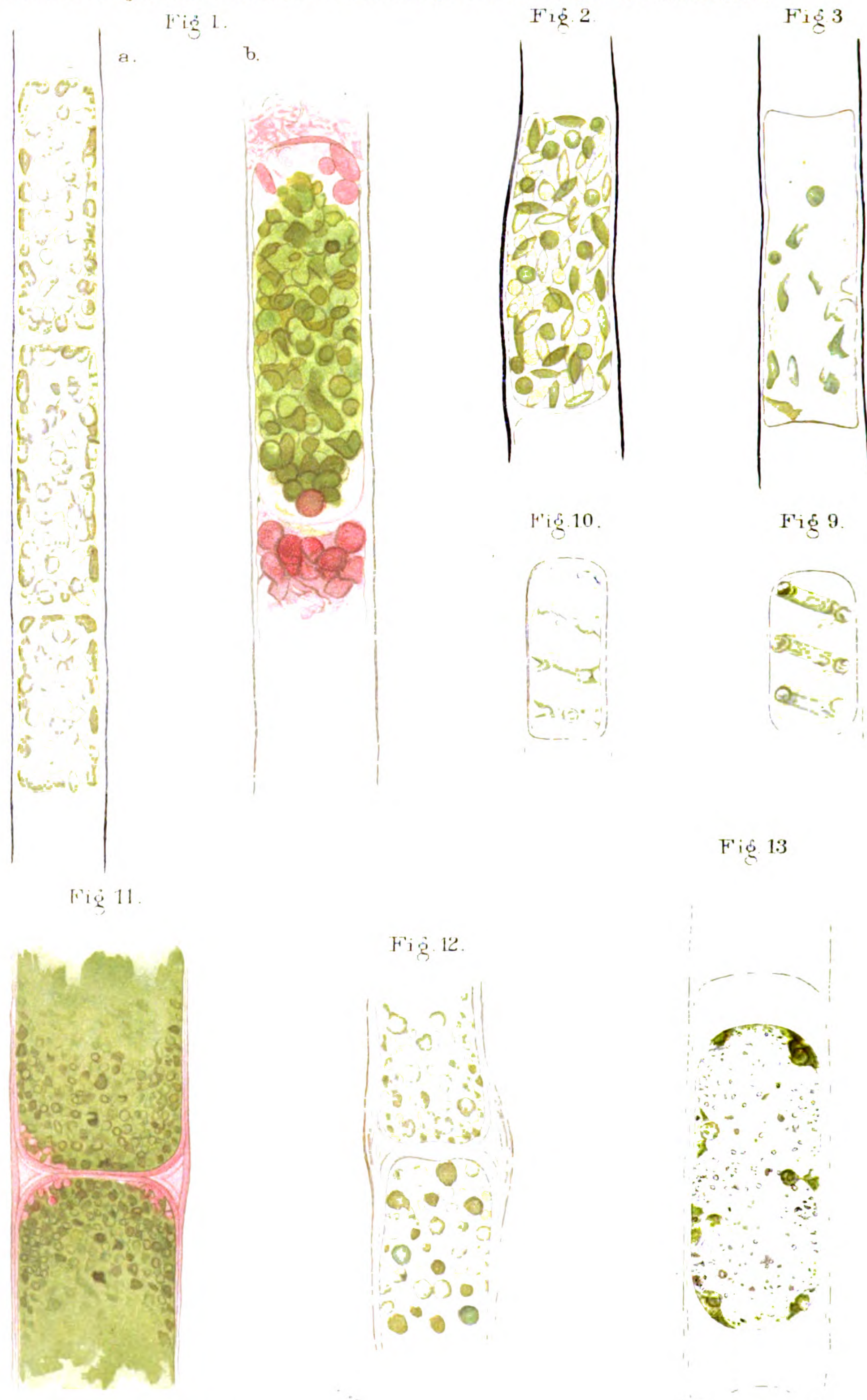

Fig. 1.
a.
b.
Fig. 2.
Fig. 3
Fig. 10.
Fig. 9.
Fig. 11.
Fig. 12.
Fig. 13

Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.

Fig. 14.

Fig. 17.

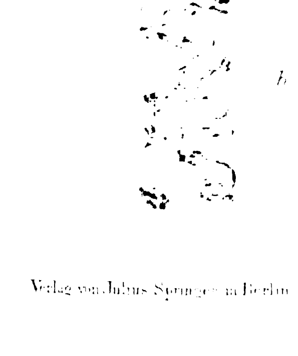
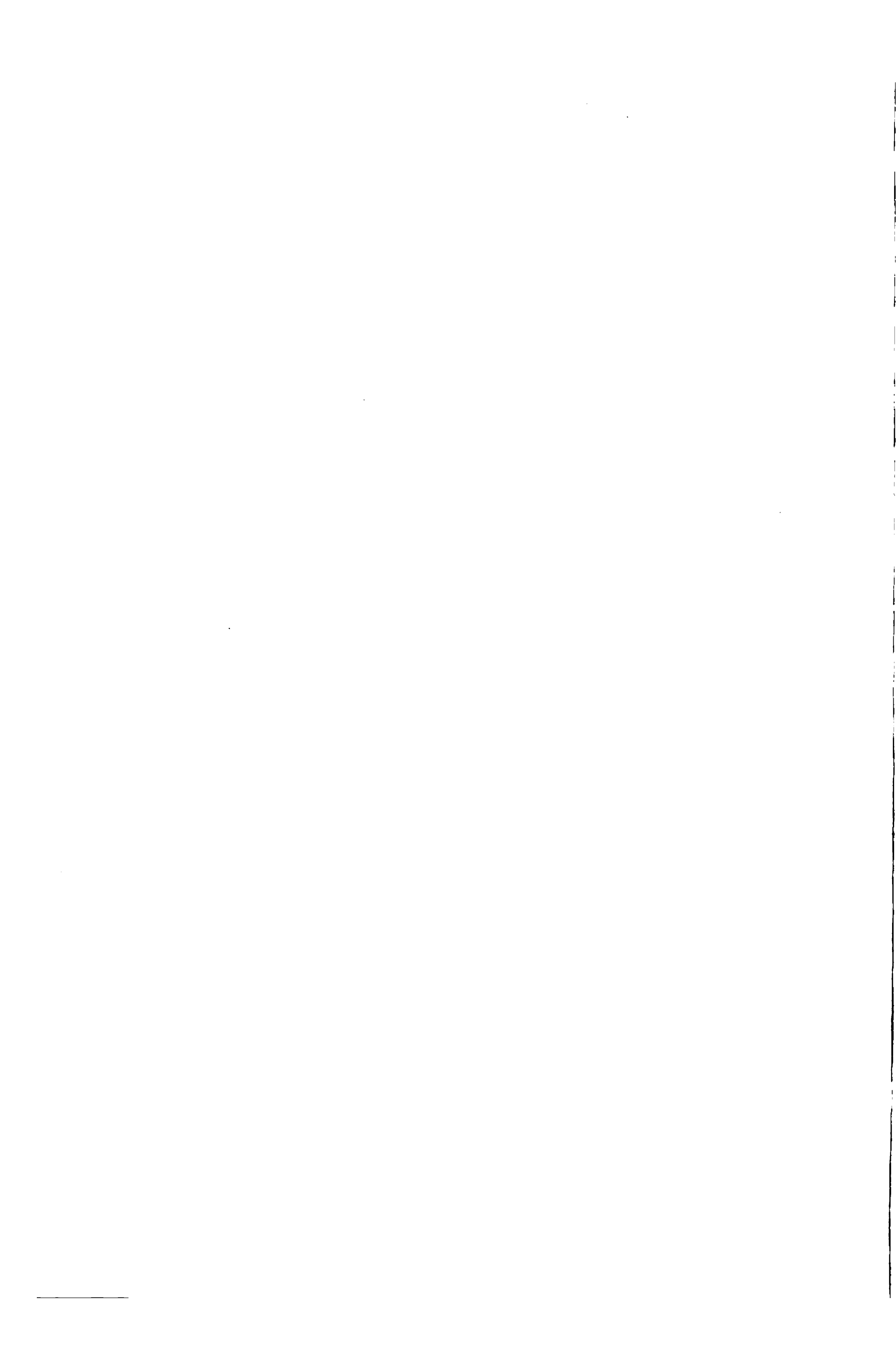
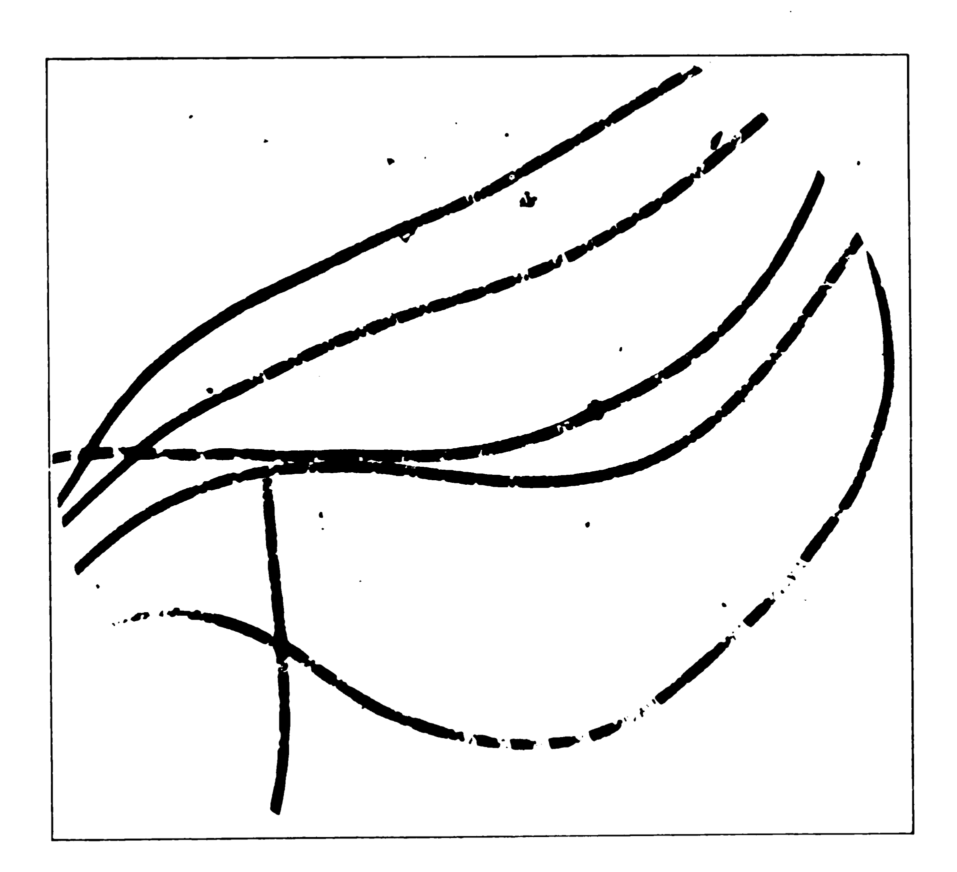


Fig. 15.

Fig. 16.

Verlag von Julius Springer in Berlin.





Über die Wirkung von Salzen auf Toxine und Toxin-Antitoxinverbindungen bei Gegenwart von Serumeiweiß.

Von

E. P. Pick und Oswald Schwarz.

(Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut in Wien.)

(Eingegangen am 18. März 1909.)

Seit den grundlegenden Untersuchungen Hofmeisters (1) über den Einfluß der Salze auf die Quellung von Gallerten hatte das Studium der Beziehungen der Salze zu Kolloiden rasch an Bedeutung zugenommen, derart, daß die gesetzmäßige Beeinflußbarkeit eines Vorganges durch Elektrolyte gleichsam zu einem Charakteristikon einer kolloidalen Reaktion geworden ist.

Noch lange ehe man begonnen hatte die Immunreaktionen vom physikalisch-chemischen Standpunkte zu betrachten, hatte es sich gezeigt, daß der Ablauf dieser Prozesse teils an die Anwesenheit von Elektrolyten gebunden, teils durch dieselben wesentlich beeinflußbar ist. Das Verdienst, diese Verhältnisse als erster systematisch untersucht zu haben, gebührt Buchner (2), der fand, daß die bactericide Wirkung des Normalserums durch Dialyse vollständig aufgehoben und durch Salzzusatz wieder reaktiviert werden kann. Bald mehrten sich analoge Erfahrungen auch auf anderen Gebieten der Immunitätslehre. Von Bordet (3) festgestellt, wurde die Bedeutung der Salze für die Bakterienagglutination von Joos (4), Friedberger (5), Porges (6) u. a. untersucht und trotz der Verschiedenheit der Ansichten über den Mechanismus der Wirkung allgemein bestätigt.

Auch für die Hämolyse zeigten sich bald ähnliche Verhältnisse geltend: Shibayama (7) fand in Anlehnung an die Versuche Buchners, daß normales Hundeserum durch Dialyse

die Fähigkeit verliert, rote Blutkörperchen aufzulösen. Ehrlich und Sachs (8) sowie Markl (9) zeigten, daß das Herantreten des Komplementes an die Verbindung Blutkörperchen-Amboceptor durch Salze verhindert wird. In neuerer Zeit haben Ferrata (10) und Sachs und Teruuchi (11) gefunden, daß komplementhaltiges Meerschweinchenserum durch Dialyse seine Wirksamkeit einbüßt. In allen Fällen, in denen Dialyse eine Immunreaktion verhinderte, konnte diese durch Salzzusatz wieder herbeigeführt werden.

Eine Reihe weiterer Arbeiten hat im Gegensatz zu den erwähnten die Wirkung von Salzzusatz zum Gegenstand, und es hatte sich gezeigt, daß einerseits auch in konzentrierten Salzlösungen Immunreaktionen ganz ungestört ablaufen können, daß aber andererseits die Gegenwart bestimmter Salze, die bei den einzelnen Prozessen verschieden sind, die Vorgänge in positivem resp. negativem Sinne beeinflussen können. Bei der Beurteilung des Mechanismus dieser Salzwirkungen zeigten sich nun dieselben Meinungsdifferenzen, wie sie bei der Beurteilung der Rolle der Elektrolyte bei Kolloidalreaktionen überhaupt zu finden sind.

Mit Hofmeister faßt Buchner in seiner oben zitierten Arbeit die Wirkung der Salze lediglich als Funktion ihrer wasserentziehenden Fähigkeit auf. Allerdings betont er, daß die Stärke der Wirkung nicht von der absoluten Konzentration der Salzteilchen, sondern von ihrem Verhältnis zu der Anzahl der Serumteilchen abhängig ist. Bei der Agglutination wird die Funktion der Salze allgemein als „Milieuwirkung" angesehen, nur Joos (l. c.) nimmt an, daß die Salze in der zweiten Phase des Prozesses, der eigentlichen Ausflockung, mit dem Reaktionsprodukt in Verbindung treten, eine Ansicht, die durch die letzten Befunde Paulis wieder an Bedeutung gewinnt. Recht eigenartige Erklärungen wurden auf dem Gebiete der hämolytischen Erscheinungen versucht. Ferrata (l. c.) nimmt an, daß das Komplement durch die Dialyse in zwei an und für sich unwirksame Bestandteile zerlegt wird. Sachs und Teruuchi (l. c.) sahen sich durch ihre Befunde zu der Annahme eines fermentartig wirkenden Serumbestandteiles genötigt, der in salzarmer Lösung das Komplement inaktiviert, aber nur in gewissen Quantitäten wirksam ist.

Bei Durchsicht der einschlägigen Literatur fällt es nun auf, wie äußerst spärlich im Vergleiche zur Bedeutung der Frage Untersuchungen sind, die sich mit der Beziehung der Salze zu den echten Toxinen (Diphtherie, Tetanus) beschäftigen. In der oben erwähnten Arbeit Buchners findet sich die Angabe, daß in salzreichen Lösungen diese Toxine gegen höhere Temperaturen resistenter sind. Knorr (12) gibt an, daß die Neutralisation von Tetanustoxin durch Gehirnemulsion in ganz auffallender Weise, durch Serum in geringerem Maße in 10%iger Kochsalzlösung gehindert wird. In allerjüngster Zeit teilte Přibram (13) Versuche mit, die zeigten, daß das Tetanustoxin als solches von mehrwertigen Salzen mehr oder weniger geschädigt wird.

Die Aufgabe der im folgenden mitzuteilenden Versuche bestand nun darin, die Beeinflußbarkeit der Bindung der echten Toxine und ihrer Antitoxine durch Salze zu untersuchen. Die Gesichtspunkte, die uns hierbei leiteten, waren folgende: Erstens stellte die Reaktion des Toxins mit seinem Antitoxin ein ungemein empfindliches Reagens für eventuelle Veränderungen der beiden Komponenten oder des Reaktionsverlaufes zwischen beiden selbst dar. Zweitens benutzten wir als Indicator den lebenden Organismus, während die bisher angestellten Untersuchungen (Hämolyse, Agglutination, Bactericidie) Reagensglasversuche waren; und drittens endlich bot sich uns eine Möglichkeit, einmal zu untersuchen, wieweit die bisher unter recht künstlichen Versuchsbedingungen gewonnenen Resultate der Kolloid-, im speziellen der Eiweißchemie auch im biologischen Versuche ihre Gültigkeit bewahren.

I. Tetanustoxin.

a) Einwirkung von Salzen mit einwertigem Kation.

Bei seinen Studien über das Tetanustoxin fand Knorr (l. c.), daß Kochsalzzusatz die Entgiftung von Tetanustoxin durch Gehirnemulsion stark abschwächt. Er mischte eine Gehirnemulsion mit einer Lösung von Tetanusgift in Wasser resp. in 10%iger Kochsalzlösung und injizierte nach 6 Tagen folgende Verdünnungen der betreffenden Mischung weißen Mäusen:

0,02 ccm (Toxin in Wasser gelöst) . . Tier überlebt
0,002 ccm „ „ „ „ . . „ „
0,02 ccm (Toxin in Salzlösung gelöst) . „ nach 1 1/2 Tg. †
0,002 ccm „ „ „ „ . „ „ 2 1/2 Tg. †

Ersetzte er die Gehirnemulsion durch Immunserum, so war der Einfluß des Salzes weniger deutlich:

5 ccm Toxin in Wasser resp. in 10%iger Kochsalzlösung gelöst + 1 ccm Antitoxin (= ca. 10000 ms); hiervon wurden injiziert:

0,02 ccm (Toxin in Wasser gelöst) . . Tier nach 1 3/4 Tg. †
0,002 ccm „ „ „ „ . . „ überlebt
0,02 ccm (Toxin in Kochsalzlösung gelöst) „ nach 24 St. †
0,002 ccm „ „ „ . . „ „ 3 Tg. †

Wie leicht einzusehen, wäre diese Tatsache, daß die giftbindende Fähigkeit eines Immunserums in so hohem Maße von dem Milieu abhängt, in dem es mit dem Toxin zusammentrifft, von großer Bedeutung für die Beurteilung seines Heileffektes und wir unterzogen daher diese Versuche zunächst einer Nachprüfung.

Die Giftlösung, mit der wir unsere Versuche anstellten, gewannen wir durch Auflösung von 0,1 g festen, mit Ammonsulfat ausgefällten Tetanustoxins, von dem 0,00001 g eine weiße Maus von ca. 20 g am dritten Tage sicher tötete. Das Serum stammte von dem hochimmunisierten Pferde „Mylight“, zu dessen Charakteristik folgender Versuch diene:

Vers. 1. 0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 13. XI. 07
14. XI. ∅
17. XI. leichter Tet.
20. XI. schwerer „
21. XI. †

Vers. 2. 0,5 ccm Serum (1500fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 13. XI. 07
14. XI. Tetanus
15. XI. „
16. XI. früh † aufgefunden.

Wiederholung des Knorrschen Versuches:

Es wurden 0,5 ccm Immunserum (in der Verdünnung 1:900) mit 0,5 ccm Toxinlösung gemischt, wobei das Toxin einmal in Wasser, das andere Mal in 10%iger Kochsalzlösung gelöst war. Von diesen Gemischen wurden folgende Verdünnungen Mäusen injiziert:

Toxin in Wasser gelöst.	Toxin in $10\,^0/_0$iger Kochsalzlösung.
Vers. 2. 0,001 ccm der Mischung. Inj. v. 13. XI. 07 Tier bleibt gesund.	Vers. 3. 0,001 ccm der Mischung. Inj. v. 13. XI. 07 Tier bleibt gesund.
Vers. 4. 0,0001 ccm Inj. v. 13. XI. 07 Tier bleibt gesund.	Vers. 5. 0,0001 ccm Inj. v. 13. XI. 07 Tier bleibt gesund.

Es wurden nun dieselben Versuche bei 1500facher Serumverdünnung angestellt:

Toxin in Wasser gelöst.	Toxin in $10\,^0/_0$iger Kochsalzlösung.
Vers. 6. 0,001 ccm Inj. v. 13. XI. Tier bleibt gesund.	Vers. 7. 0,001 ccm Inj. v. 13. XI. Tier bleibt gesund.
Vers. 8. 0,0001 ccm Inj. v. 13. XI. Tier bleibt gesund.	Vers. 9. 0,0001 ccm Inj. v. 13. XI. Tier bleibt gesund.

Dieselben Versuche wurden nun mit $20\,^0/_0$iger Kochsalzlösung wiederholt:

Toxin in Wasser gelöst.	Toxin in $20\,^0/_0$iger Kochsalzlösung.
Vers. 10. 0,5 ccm Serum (1500fach verd.) + 0,5 ccm Toxin. Inj. v. 18. XI. abds. 19. XI. schwerer Tet.; abds. †	Vers. 11. Wie in Vers. 10. Inj. v. 18. XI. abds. 19. XI. früh † aufgefunden (Salztod!)
Vers. 12. Obige Mischung 3fach verd. u. davon 1 ccm injiziert. Inj. v. 18. XI. 19. XI. Tetanus 20. XI. früh † aufgefund.	Vers. 13. Wie in Vers. 12. Inj. v. 18. XI. 19. XI. Tet.; abds. 8^h †
Vers. 14. Mischung von Vers. 10 6fach verd. u. davon 1 ccm injiz. Inj. v. 18. XI. 19. XI. Tetanus 20. XI. vorm. †	Vers. 15. Wie in Vers. 14. Inj. v. 18. XI. 19. XI. schwerer Tet. 20. XI. 3^h nachm. †

Es hatte sich also im Gegensatz zu den Angaben Knorrs auch bei vielfacher Wiederholung dieser Versuche gar kein Einfluß des Salzes auf die Toxine, weder auf deren Giftigkeit noch auf die Fähigkeit, vom Serum neutralisiert zu werden, gezeigt.

Wir änderten hierauf die Technik der Versuche in der Weise ab, daß wir die Serumverdünnungen in der zu unter-

suchenden Salzlösung herstellten und das Toxin in Wasser gelöst zusetzten.

Serumverdünnung in physiol. Kochsalzlösung.	Serumverdünnung in 5%iger Kochsalzlösung.
Vers. 16. 0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin. Inj. v. 8. III. 08 Das Tier bleibt gesund.	Vers. 17. Wie in Vers. 16. Inj. v. 11. III. 13. III. ∅ 14. III. leichter Tet. 16. III. ∅ Tier überlebt.
Vers. 18. 0,5 ccm Serum (1200fach verd.) + 0,5 ccm Toxin. Inj. v. 13. III. 14. III. ∅ 15. III. schwerer Tet. 16. III. früh † aufgefund.	Vers. 19. Wie in Vers. 18. Inj. v. 13. III. 14. III. ∅ 15. III. schwerer Tet. abds. 10h †
Vers. 20. 0,5 ccm Serum (1500fach verd.) + 0,5 ccm Toxin. Inj. v. 13. III. 14. III. Tetanus 15. III. früh † aufgefund.	Vers. 21. Wie in Vers. 20. Inj. v. 13. III. 14. III. Tetanus 15. III. 10h vorm. †

Diese Versuche sind wiederholt mit dem gleichen Ergebnis ausgeführt worden und zeigen im Gegensatz zu den Angaben Knorrs, daß eine 5-, 10- und 20%ige Kochsalzlösung gar keinen Einfluß auf die Bindung des Tetanustoxins durch das Antitoxin besitzt, gleichgültig ob die Salzlösung als Lösungsmittel für das Toxin oder zur Verdünnung des Serums verwendet wurde.

Um so leichter dagegen ist der Effekt der Salze auf die giftbindende Fähigkeit der Gehirnemulsion in der Knorrschen Versuchsanordnung zu verstehen: Landsteiner und v. Eisler (19), Takaki (20) u. a. haben gezeigt, daß die giftbindende Eigenschaft des Gehirnes zum größten Teil auf seinen Gehalt an Lipoiden zurückzuführen ist; andererseits ist die leichte Fällbarkeit der Lipoide durch Salze aus den Untersuchungen von Mayer (21), Höber (22), Porges und Neubauer (23) hinlänglich bekannt. Es könnte demnach die scheinbar neutralisationshemmende Wirkung des Kochsalzes in den Versuchen Knorrs auf das Ausflockungsvermögen der Salze zurückgeführt werden. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich aus neueren Versuchen von Landsteiner und Raubitschek (24), die zeigen konnten, daß die Adsorptionsverbindung Protagon-Schlangengift bei Anwesenheit

von Kochsalz dissociiert wird, während sie in wässeriger Lösung beständig ist.

Unsere negativen Resultate bezüglich des Einflusses von Kochsalz auf die Bindung von Toxin-Antitoxin zeigen neuerdings, daß zwischen dem Giftbindungsvermögen des Gehirnes und dem des Immunserums ein prinzipieller Unterschied besteht.

Auch einige andere einwertige Salze, in gleicher Versuchsanordnung untersucht, ließen keine hemmende Wirkung erkennen.

Serumverdünnung in physiol. Kochsalzlösung.

Vers. 22. 0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 5. III.
Tier überlebt.

Vers. 24. 0,5 ccm Serum (1800fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 5. III.
6. III. leichter Tet.
7. III. abds. †

Serumverdünnung in $2^0/_0$iger Ammonsulfatlösung.

Vers. 23. Wie in Vers. 22.
Inj. v. 6. III.
Tier überlebt.

Vers. 25. Wie in Vers. 24.
Inj. v. 6. III.
7. III. Tetanus
8. III. mittags †

Serumverdünnung in $5^0/_0$iger Natriumsulfatlösung.

Vers. 26. 0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 11. III.
Tier überlebt.

Vers. 27. 0,5 ccm Serum (1800fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 11. III.
12. III. Tetanus
13. III. abds. †

Serumverdünnung in $1^0/_0$iger Ammoniumbromidlösung.

Vers. 28. 0,5 ccm Serum (1800fach verd.) + 0,5 ccm Toxin.
Inj. v. 11. III.
12. III. leichter Tet.
13. III. schwerster Tet.
14. III. früh † aufgefunden.

Nachdem sich also gezeigt hatte, daß die Gegenwart von Salzen mit einwertigem Kation wie NaCl, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)Br$ auf den Neutralisationsvorgang von Toxin durch Antitoxin keinerlei Einfluß hat, war noch zu untersuchen, wie sich diese Salze der gefestigten Toxin-Antitoxinverbindung gegenüber verhalten. Als Beispiel diene der folgende Versuch, der aus einer Reihe ähnlicher Versuche herausgegriffen ist. Er läßt keinerlei Wirkung der Salze erkennen, gemessen an der Giftigkeit des Gemisches.

Vers. 29. 0,5 ccm Serum (1800 fach verd. in 5 $^{0}/_{0}$iger Ammonsulfatlösung) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 17. VIII. 08
18. VIII. Tetanus
19. VIII. morgens †

Vers. 30. 0,5 ccm Serum (1800 fach verd. in physiol. Kochsalzlösung) + 0,5 ccm Toxin. Nach $^{3}/_{4}$ Std. werden 0,5 ccm 5 $^{0}/_{0}$ige Ammonsulfatlösung angesetzt.
Inj. v. 17. VIII. 08
18. VIII. Tetanus
19. VIII. mittags †

Es wurden noch in analogen Versuchen die Sera der mit Tetanustoxin immunisierten Pferde „Drusus" und „Genius" untersucht; die Resultate stimmen mit den mitgeteilten, mit Serum „Mylight" gewonnenen Versuchsergebnissen vollkommen überein.

Wir müssen die Ergebnisse dieser Untersuchungen also dahin zusammenfassen, daß weder das Tetanustoxin, noch der Neutralisationsprozeß des Tetanustoxins durch das Antitoxin, noch die fertige Toxin-Antitoxin-Verbindung durch Salze mit einwertigem Kation irgendwie beeinflußt werden.

b) Einwirkung von Salzen mit zwei- und dreiwertigem Kation.

Ganz anders lagen nun die Verhältnisse, als wir zur Prüfung mehrwertiger Salze übergingen; auch hier hatten wir die zwei Fragen zu berücksichtigen: einmal die Salzwirkung auf die beiden Komponenten Toxin und Serum, dann den Einfluß auf die fertige Verbindung.

Es gestaltete sich demnach die Technik in allen folgenden Versuchen folgendermaßen: erstens wurden die Serumverdünnungen in der betreffenden Salzlösung hergestellt und die Proben vor dem Toxinzusatz $^{3}/_{4}$ Stunden in den Brutschrank gestellt. In der zweiten Gruppe wurde das Serum in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, das Toxin zugesetzt und die Proben ebenso lange im Brutschrank gelassen; hierauf wurden zu den ersten Proben 0,5 ccm Toxinlösung, zu denen der zweiten Gruppe 0,5 ccm der zu prüfenden Salzlösung zugesetzt und die Proben nach ca. $^{1}/_{4}$ Stunde injiziert. Um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden die Mischungen der ersten Gruppe noch mit 0,5 ccm physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Bei der Wahl der Salze und deren Konzentrationen waren wir durch die mehr oder minder große Giftigkeit der löslichen

Salze beschränkt; wir verwendeten stets die höchsten Salzkonzentrationen, welche die Mäuse noch anstandslos vertrugen. Die Versuche wurden ausgeführt mit Calciumacetat, Magnesiumsulfat und Aluminiumsulfat.

1. Versuche mit $1^{1}/_{2}\,^{0}/_{0}$iger Calciumacetatlösung.

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 31. 0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. leichter Tet.
12. VIII. abds. †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. leichter Tet.
12. VIII. moribund
13. VIII. früh † gef.

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 32. [0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm Calciumlösung.
Inj. v. 21. VIII.
22. VIII. ∅
23. VIII. abds. †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 21. VIII.
22. VIII. leichter Tet.
23. VIII. abds. †

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 33. 0,5 ccm Serum (1200fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 17. VIII.
18. VIII. leichter Tet.
19. VIII. schwerer Tet.
abds. †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 17. VIII.
18. VIII. leichter Tet.
19. VIII. schwerer Tet. †

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 34. [0,5 ccm Serum (1800fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm Calciumlösung.
Inj. v. 1. VIII.
4. VIII. leichter Tet.
5. VIII. schwerer Tet.
7. VIII. abds. †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 1. VIII.
4. VIII. Tetanus
5. VIII. mittags †

Während also bei 1200facher Verdünnung des Serums die Tiere, in den Versuchen, bei denen die Serumverdünnungen in $1^{1}/_{2}\,^{0}/_{0}$iger Calciumacetatlösung gemacht wurden, gleichzeitig mit den Kontrolltieren eingingen, trat in der zweiten Versuchsanordnung eine geringe, aber deutliche Abschwächung des Tetanustoxins ein. Bei 900facher Serumverdünnung ist eine solche Differenz nicht wahrnehmbar.

Verwendet man nun zu diesen Versuchen eine $2^{0}/_{0}$ige

Calciumacetatlösung, so ist, wie die gleich anzuführenden Versuche zeigen, dieselbe Abschwächung der Toxicität bei Zusatz des Salzes zu der Toxin-Antitoxinverbindung zu konstatieren.

Vers. 35. 0,5 ccm Serum (in 2%iger Calciumacetatlösung auf das 1200-fache verd. + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. NaCl-Lösung.
Inj. v. 5. VIII. abds. 9h
6. VIII. früh † aufgefund.

Vers. 38. 0,5 ccm Serum (in physiol. NaCl-Lösung 1200 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. NaCl-Lösung.
Inj. v. 5. VIII.
6. VIII. leichter Tet.
7. VIII. 4h nachm. †

Vers. 36. 0,5 ccm Serum (in physiol. Kochsalzlösung 1200 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin; nach 10 Min. 0,5 ccm 2%ige Calciumacetatlösung hinzugefügt.
Inj. v. 5. VIII. abds. 9h
6. VIII. früh † aufgefund.

Vers. 37. 0,5 ccm Serum (in physiol. NaCl-Lösung 1200 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin; nach 3/4 Std. werden 0,5 ccm 2%ige Calciumacetatlösung hinzugefügt.
Inj. v. 5. VIII.
6. VIII. ∅
8. VIII. Tetanus
9. VIII. schwerst. Tet. abds. 9h
10. VIII. früh † aufgefunden.

Gleichzeitig aber läßt sich an diesen Versuchen eine interessante Beobachtung machen, der vielleicht eine prinzipielle Bedeutung zukommt: 1 ccm einer 2%igen Calciumacetatlösung wird von Mäusen von 15 bis 20 g gerade noch vertragen, d. h. die Tiere erholen sich von der Salzwirkung mehr oder minder bald und überleben durchwegs. Werden nun die Serumverdünnungen in einer 2%igen Salzlösung angestellt, so gehen die Tiere kurze Zeit nach Injektion der früher unschädlichen Dosis an einem typischen Salztod ein. Es scheint also hier eine Steigerung der Giftigkeit des Calciums eingetreten zu sein. Wird aber das Salz, wie in den früheren Versuchen, erst zu der fertigen Toxin-Antitoxinverbindung, d. h. 3/4 Stunden nach Zusatz des Toxins zum Serum hinzugefügt, so ist diese Giftigkeitserhöhung nicht mehr zu erzielen; wohl aber ist dies der Fall, wenn der Salzzusatz zu der noch lockeren Toxin-Antitoxin-Verbindung z. B. schon 10 Minuten nach der Mischung des Toxin mit dem Antitoxin erfolgt. Es scheint demnach, als ob diese Giftigkeitserhöhung des Calciums eine Wirkung des Serums wäre, welches diese Eigenschaft aber nach seiner Verbindung mit dem Toxin verlieren würde. Wir kommen auf diese Versuche noch an einer späteren Stelle zu sprechen.

2. Versuche mit $2^0/_0$iger Magnesiumsulfatlösung.

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 39. 0,5 ccm Serum (900 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. ∅
17. VIII. ∅
19. VIII. verdächtig
21. VIII. leichter Tet.
25. VIII. „ „
Tier überlebt.

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. leichter Tet.
12. VIII. schwerer Tet.
13. VIII. †

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 40. [0,5 ccm Serum (900 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm $2^0/_0$ige Magnesiumsulfatlösung.
Inj. v. 21. VIII.
22. VIII. leichter Tet.
24. VIII. schwerer Tet.
abds. 7^h †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 21. VIII.
22. VIII. Tetanus
24. VIII. mittags †

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 41. 0,5 ccm Serum (1200 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
9. VIII. ∅
12. VIII. verdächtig
17. VIII. leichter Tet.
21. VIII. „ „
26. VIII. „ „
Tier überlebt.

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
8. VIII. Tetanus
9. VIII. schwerer Tet.; abds. 9^h †

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 42. 0,5 ccm Serum (1200 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin; nach 10 Min. werden 0,5 ccm $2^0/_0$ige Magnesiumsulfatlösung zugesetzt.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. ∅
13. VIII. leichter Tet.
14. VIII. schwerer Tet.
15. VIII. früh † aufgefund.

Vers. 43. 0,5 ccm Serum (1200 fach verd.) + 0,5 ccm Toxin; nach $^3/_4$ Std. werden 0,5 ccm $2^0/_0$ige Magnesiumsulfatlösung zugesetzt.
Inj. v. 7. VIII.
8. VIII. schwerer Tet.
9. VIII. mittags †

Man sieht, daß Magnesiumsulfat einen ganz anderen Typus in seiner Wirkung zeigt, als das Calciumacetat. Wird das Serum in der Salzlösung verdünnt, so werden die Tiere fast vollkommen vor der Vergiftung mit Tetanustoxin

geschützt; wenn das Salz aber erst zu der fertigen Toxin-Antitoxinverbindung zugesetzt wird, so gehen die Tiere gleichzeitig mit den Kontrolltieren ein. Von besonderem Interesse ist das Ergebnis des Versuches Nr. 42: In diesem Falle ist nach 10 Minuten langem Stehen der Mischung die Bindung des Toxins durch das Antitoxin noch nicht vollkommen vollzogen; dementsprechend hält das Resultat in bezug auf die Salzwirkung gleichsam die Mitte zwischen denen der beiden anderen Versuche (41 und 43), indem das Versuchstier vor der tödlichen Tetanuswirkung zwar nicht völlig geschützt bleibt, wie in Versuch Nr. 41, jedoch erst nach 8 Tagen an Tetanus zugrunde geht, während die Maus im analogen Versuche Nr. 43, in welchem erst nach $^3/_4$stündigem Stehen der Toxin-Antitoxinmischung der Salzzusatz erfolgte, bereits nach 24 Stunden einen schweren Tetanus zeigt, dem sie am 2. Tage erliegt.

3. Versuche mit $2^0/_0$iger Aluminiumsulfatlösung.

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 44. 0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. ∅
11. VIII. Tetanus
13. VIII. †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. verdächtig
11. VIII. Tetanus
13. VIII. †

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 45. [0,5 ccm Serum (900fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm $2^0/_0$ige Aluminiumsulfatlösung.
Inj. v. 21. VIII.
22. VIII. ∅
23. VIII. Tetanus
24. VIII. abds. †

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 21. VIII.
22. VIII. ∅
23. VIII. Tetanus
24. VIII. †

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 46. 0,5 ccm Serum (1200fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 1. VIII.
4. VIII. ∅
5. VIII. Tetanus
6. VIII. schwerster Tet.
7. VIII. früh † aufgef.

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 1. VIII.
4. VIII. verdächtig
5. VIII. schwerer Tet.
6. VIII. früh † aufgef.

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 47. [0,5 ccm Serum (1200fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm 2 %ige Aluminiumsulfatlösung.
Inj. v. 1. VIII.
5. VIII. ∅
8. VIII. ∅
9. VIII. leichter Tet.
10. VIII. abds. †

Kontrolle.
Siehe Vers. 46.

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 48. 0,5 ccm Serum (1500fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 5. VIII. abds.
6. VIII. Tetanus
7. VIII. früh † aufgef.

Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 5. VIII. abds.
6. VIII. Tet.; abds. 9h †

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 49. [0,5 ccm Serum (1500fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm 2 %ige Aluminiumsulfatlösung.
Inj. v. 5. VIII.
7. VIII. ∅
10. VIII. ∅
13. VIII. Tetanus
14. VIII. „
16. VIII. †

Kontrolle.
Siehe Vers. 48.

Serum in der Salzlösung verdünnt.

Vers. 50. 0,5 ccm Serum (1800fach verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 7. VIII.
8. VIII. Tet.; abds. †

Nachträglicher Salzzusatz.

Vers. 51. [0,5 ccm Serum (1800fach verd.) + 0,5 ccm Toxin] + 0,5 ccm 2 %ige Aluminiumsulfatlösung.
Inj. v. 7. VIII.
10. VIII. ∅
13. VIII. ∅
15. VIII. Tetanus
17. VIII. „
19. VIII. †

In dieser Versuchsreihe ist der Typus der Salzwirkung am schönsten ausgeprägt; er nähert sich dem des Calciums: bei 900facher Verdünnung sterben auch hier bei beiden Arten der Versuchsanordnung die Tiere gleichzeitig mit den Kontrollen; bei den höheren Serumverdünnungen überleben die Tiere in den Versuchen mit nachträglichem Salzzusatz die zugehörigen Kontrollen selbst 10 Tage lang (Vers. Nr. 49, 50 u. 51). Wird

das Serum aber mit der Salzlösung verdünnt, so ist keinerlei Wirkung des Salzes zu beobachten.

Bei Deutung dieser Resultate ist an erster Stelle zu berücksichtigen, daß Aluminiumsulfatlösungen durch das hohe Dissoziationsvermögen des Salzes eine beträchtliche Acidität besitzen, welche die Ergebnisse unserer Versuche in bestimmter Richtung beeinflussen konnte, da das Tetanustoxin gegen Säurewirkung sehr empfindlich ist. Da das Aluminiumhydrat noch lange vor Erreichung des Neutralisationspunktes ausfällt, lassen sich die Aluminumsulfatlösungen nicht direkt neutralisieren. Wir suchten daher zunächst auf indirektem Wege den Einfluß der Säure auszuschalten oder wenigstens in seinem Ausmaße festzustellen.

Die Acidität unserer 2%igen Aluminiumsulfatlösungen entsprach genau einer $^n/_4$-Salzsäure, und wir stellten daher zunächst Kontrollversuche mit dieser Säure in der angegebenen Konzentration an.

Vers. 52. 0,5 ccm Serum (1500fach in $^n/_4$-HCl verd.) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.	Kontrolle in physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 10. VIII.	Inj. v. 10. VIII. abds.
13. VIII. ∅	11. VIII. „ †
15. VIII. Tetanus	
16. VIII. früh † aufgefunden.	

Vers. 53. 0,5 ccm Serum (1500fach in physiol. NaCl-Lösung verd.) + 0,5 ccm Toxin; nach $^3/_4$ Std. Zusatz von 0,5 ccm $^n/_4$-HCl.
Inj. v. 10. VIII.
13. VIII. ∅
15. VIII. Tetanus
16. VIII. vorm. 10^h †

Es zeigt sich nun, daß das Tier in Vers. 52 um 4 Tage länger lebt als die Kontrolle und die Maus im entsprechenden Versuche mit Aluminiumsulfat: das Tetanustoxin ist also hier absolut stärker geschädigt als durch die entsprechende Aluminiumsulfatlösung. In beiden Versuchsanordnungen (Vers. 52 und 53) starben die Tiere zu gleicher Zeit; es ist demnach der eigentümliche Typus der Aluminiumwirkung, der sich aus den früheren Versuchen ergibt und durch den bedeutenden Unterschied in der Salzwirkung einerseits auf die beiden getrennten Komponenten, nämlich Toxin und Antitoxin, andererseits auf die fertige Toxin-Antitoxinverbindung charakterisiert ist, hier

nicht nachzuweisen und daher nicht durch Säurewirkung allein zu erklären.

Viel prägnanter ließ sich die Trennung der Säure- von der Salzwirkung bei Verwendung von Aluminiumsulfatlösungen in folgendem Versuch illustrieren: Da durch die Verdünnung der Salzlösung die Ionendissoziation gesteigert wird, so war zu erwarten, daß in stärkeren Verdünnungen der Salzlösung die Säurewirkung gegenüber der Wirkung des Salzes mehr hervortreten müsse. Ein Versuch mit 0,5%iger Aluminiumsulfatlösung bestätigte diese Überlegung.

Vers. 54. 0,5 ccm Serum (1200fach verd. in 0,5%iger Aluminiumsulfatlösung) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. NaCl-Lösung.

Inj. v. 19. VIII.
21. VIII. ∅
24. VIII. ∅
26. VIII. verdächtig
29. VIII. „
Tier überlebt.

Vers. 55. 0,5 ccm Serum (1200fach verd. in physiol. NaCl-Lösung) + 0,5 ccm Toxin; nach 3/4 Std. Zusatz von 0,5 ccm 0,5%iger Aluminiumsulfatlösung.

Inj. v. 19. VIII.
21. VIII. ∅
24. VIII. ∅
26. VIII. leichter Tetanus
29. VIII. „ „
Tier überlebt.

Der für Aluminium charakteristische Typus ist also durch diese Steigerung der Dissoziation vollkommen verwischt, indem die reine Salzwirkung zurückgedrängt worden war und die Säurewirkung dermaßen in Vordergrund rückte, daß die Versuchsergebnisse mit den mit reiner Salzsäure erzielten vollkommen übereinstimmen.

Es ist nun von Interesse, daß auch Pauli und Handowski dieselbe Versuchsanordnung, die wir unabhängig von diesen Autoren verwendeten, zu gleichem Zwecke benutzten, um den Einfluß der Salz- und Säurewirkung auf die Hitzekoagulation des Eiweißes zu trennen. Bei Verwendung von dreiwertigen Salzen ($AlCl_3$) machte sich nämlich die Hemmung der Koagulation durch die H-Ionen in überwiegender Weise geltend. Durch Zurückdrängen der Dissoziation bei höheren Konzentrationen trat die Salzwirkung immer mehr hervor und bei Verwendung von dreifach normalen Salzlösungen erfolgte typische Neutralsalzfällung bei Zimmertemperatur. Auch die Phosphate und Carbonate nehmen eine Mittelstellung ein zwischen reiner Laugenwirkung und der Herabsetzung der Viscosität von Eiweiß-

lösungen durch neutrale Elektrolyte. Die weitgehende Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen ist leicht zu erkennen.

Übersicht der Versuchsresultate des vorigen Kapitels.

Überblicken wir nun die Versuche über die Wirkung der Salze mit mehrwertigem Kation — eine größere Anzahl war wegen der hochgradigen Giftigkeit der löslichen Salze nicht zu verwenden — so lassen sich zwei Typen der Wirkung aufstellen: Calcium- und Aluminiumsalze zeigten ihre entgiftende Wirkung nur bei Zusatz der Salze zu der fertigen Toxin-Antitoxinverbindung, während Magnesiumsalze ihre Wirkung nur auf die isolierten Komponenten entfalteten.

Bei einer Deutung dieser Tatsachen sind zunächst die interessanten Versuche E. Přibrams zu berücksichtigen, die u. a. ergaben, daß mehrwertige Salze Tetanustoxin mehr oder weniger schädigen; diese Wirkung war ausschließlich eine Funktion der Natur des Kations. Während Přibram die Einwirkung der Salze auf Toxin allein, also dem nativen Eiweiß bereits ziemlich fernstehende Eiweißkörper untersuchte, haben wir es in unseren Lösungen mit einem Komplex von genuinem Eiweiß (Antitoxin), Albumosen (Toxin) und Salzen zu tun, und zwar einmal in der Reihenfolge Antitoxin-Salz-Toxin, das anderemal Antitoxin-Toxin-Salz. Es sind daher die von Přibram an reinen Toxinlösungen gemachten Erfahrungen nicht ohne weiteres auf unsere Versuche zu übertragen.

Den für die Erklärung einfachsten Fall stellen die Versuche mit Magnesiumsulfat dar: Hier zeigt sich, wie erwähnt, daß das Salz seine zerstörende Wirkung auf das Toxin dann entfaltet, wenn das Serum in der Salzlösung verdünnt und das Toxin nachträglich zugesetzt wurde, so daß das Salz auf beide Komponenten getrennt einwirken konnte, während bei Zusatz des Salzes zu der fertigen Verbindung das Toxin durch das Serum scheinbar vor der Salzwirkung geschützt wurde; dieser Schutz war ein um so intensiverer, je später nach der Vereinigung von Toxin und Antitoxin der Salzzusatz stattfand, d. h. je fester die Toxin-Antitoxinverbindung bereits vollzogen war. Die Ergebnisse der Versuche nach der ersten Versuchsanordnung decken sich ganz mit den Angaben Přibrams, so

daß wir das Überleben der Tiere gegenüber den Kontrollen auf eine Abschwächung des Toxins durch das Salz zurückführen müssen. Das Versagen der Salzwirkung in der zweiten Versuchsgruppe ergibt zunächst, daß aus der vollzogenen Bindung des Toxins durch das Antitoxin ein neuer Komplex resultiert, dem gegenüber der zerstörende Einfluß der Magnesiumsalze nicht mehr zum Ausdruck kommen kann.

Wenden wir uns nun zu der Besprechung der Versuche mit Calcium- und Aluminiumsalzen, so begegnen wir hier viel komplizierteren Verhältnissen. Es zeigt sich vor allem die höchst auffallende Tatsache, daß bei Zusatz des Salzes zu der Toxin-Antitoxinverbindung die Versuchstiere die Kontrollen weit überleben. Zur Erklärung dieses Phänomens könnte man zunächst daran denken, daß im Salzmilieu die Avidität des Toxins zu dem Antitoxin bedeutend gesteigert ist, so daß eine innigere Bindung als die Ursache der geringeren Giftigkeit des Gemisches anzusprechen wäre. Gegen diese Annahme sprechen aber die Beobachtungen, daß eine Salzwirkung sich in den früheren Stadien des Neutralisationsprozesses (10 Minuten nach Zusatz des Toxins zum Serum) fast gar nicht nachweisen läßt, während doch eine Aviditätserhöhung sich gerade im zeitlichen Ablauf einer Reaktion ausprägen müßte. Andrerseits läßt diese Annahme einer Aviditätsbeeinflussung das Verhalten der Salze bei getrennter Einwirkung auf die beiden Komponenten völlig ungeklärt, wobei es doch höchst bemerkenswert ist, daß scheinbar entgegen den Angaben Přibrams sich die Salze dem Toxin gegenüber völlig indifferent verhalten.

Eine viel größere Wahrscheinlichkeit bietet dagegen eine Annahme, die gestattet, die Resultate beider Versuchsanordnungen unter einem einheitlichen Gesichtspunkte zu betrachten, indem sie die physikalisch-chemischen Beziehungen der reagierenden Körper in den Vordergrund stellt.

Unsere Versuche, in denen das Toxin zu dem in der Calciumsalzlösung verdünnten Serum zugesetzt wird, unterscheiden sich von denen Pribrams nur durch die Anwesenheit des Serums. Die Differenz der Resultate nötigt daher zu der Annahme, daß die Gegenwart des Serumeiweißes eine ganz prinzipielle Rolle bei der Einwirkung dieser Salzionen auf das

Toxin besitzt, die darin besteht, daß das Serumeiweiß die zerstörende Wirkung des Calciums resp. Aluminiums von dem nachher zugesetzten Toxin ablenkt, d. h. daß die Adsorptionsverbindung Eiweiß-Salz nach $^3/_4$ stündigem Stehen für das Toxin ungiftig geworden ist, ohne daß die antitoxische Kraft des Serums eine Einschränkung erfahren hat.

Wir hätten somit auf diese Weise eine empfindliche Methode gewonnen, auf biologischem Wege Calcium- resp. Aluminium-Eiweißadsorptionsverbindungen nachzuweisen.

In der zweiten Versuchsgruppe, bei dem Zusatze der Salze zu der Toxin-Antitoxinverbindung, haben wir es dagegen mit der Einwirkung dieser Salze auf einen Komplex zu tun, den wir als Eiweiß-Albumosen-Adsorptionsverbindung auffassen können und der den Salzen gegenüber weder die Eigenschaften des ursprünglichen Antitoxineiweißes noch jene des Toxins besitzt.

Mit Hilfe dieser Annahme der Adsorption der Salzionen durch das Serum resp. die Toxin-Antitoxinverbindung läßt sich am besten die verschiedene Wirkung der Salze in beiden Versuchsanordnungen erklären, indem nämlich in dem einen Falle das Serum durch Adsorption des Calciums resp. Aluminiums diese Kationen gleichsam vom Toxin ablenkt, während im zweiten Falle, in welchem die Toxin-Antitoxinverbindung das adsorbierende Material darstellt, das Toxin durch seine Bindung an das Antitoxin dem Einfluß des Salzes zugänglich wird.

Einen weiteren Beleg für die verschiedene Wirkung, welche die Adsorption des Calciums einmal durch Serumeiweiß, das anderemal durch die Toxin-Antitoxinverbindung ausübt, kann man in den früher bereits erwähnten Versuchen erblicken, in denen eine $2^0/_0$ige, an sich nicht tödliche Calciumlösung durch Adsorption an Serumeiweiß eine erhöhte Giftigkeit für Mäuse gewinnt, während die Calcium-Serum-Toxin-Adsorptionsverbindung eine solche Giftigkeitssteigerung nicht erkennen läßt. Als Analogie zu diesen Versuchen können die Beobachtungen Levaditis und Yamanouchis (14) aufgefaßt werden, daß gewisse für Trypanosomen in vitro ungiftige Atoxylverbindungen als Atoxyl-Eiweißverbindungen in Form von Extrakten aus der Leber mit Atoxyl vorbehandelter Tiere für lebende Zellen ver-

schiedenster Provenienz wie Trypanosomen, Spermatozoen usw. schon im Reagensglase deutlich giftig wirkten. In einer durchaus der unserigen ähnlichen Versuchsanordnung konnten interessanterweise auch Breinl und Nierenstein (26) jüngst zeigen, daß Atoxyldosen, welche an sich von Ratten ohne Schaden ertragen wurden, in Kombination mit Eselserum („Atoxylserum") die Tiere unter typischen Erscheinungen der Atoxylvergiftung töteten.

Bei der Annahme, die wir der Erklärung unserer Ergebnisse zugrunde legten, spielt das Immunserum nur die Rolle eines Eiweißkolloides, das einerseits das Salz allein, im anderen Falle Toxin und Salz adsorbiert. Wenn diese Vorstellung nun richtig ist, so müßte es gelingen, ähnliche Typen der Salzwirkung zu erzielen, wenn das Immunserum in beiden Versuchsanordnungen durch normales Serum ersetzt wird.

Wir stellten daher folgende Versuche an:

Vers. 56. 0,5 ccm Toxin (= 0,000 05 g) + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 20. VIII. früh
21. VIII. mittags schw. Tet.; abds. †

Vers. 57. 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm $1^1/_2$%ige Calciumacetatlösung.
Inj. v. 20. VIII. früh
21. VIII. Andeutung v. Tet.
22. VIII. mittags Tetanus; abds. †

Vers. 58. 0,5 ccm normales Pferdeserum (1200fach verd. in $1^1/_2$%iger Calciumacetatlösung) + 0,5 ccm Toxin + 0,5 ccm physiol. Kochsalzlösung.
Inj. v. 20. VIII.
21. VIII. mittags schwerster Tetanus; abds. †

Vers. 59. 0,5 ccm normales Pferdeserum (1200fach verd. in physiol. Kochsalzlösung) + 0,5 ccm Toxin; nach $^3/_4$ Std. Zusatz von 0,5 ccm $1^1/_2$%iger Calciumacetatlösung.
Inj. v. 20. VIII.
21. VIII. Andeutung v. Tet.
22. VIII. Tetanus; abds. †

Entsprechend den Angaben Přibrams geht zunächst aus Vers. 57 hervor, daß das Toxin von dem Salze geschädigt wird: das Tier überlebt die Kontrolle um 24 Stunden. In dem Versuche Nr. 58, in welchem das Serum in der Calciumacetatlösung verdünnt worden war, fällt in Übereinstimmung mit den Versuchen mit Immunserum die Calciumwirkung völlig aus. Setzten wir aber das Calcium zu der Lösung des Toxins im Serum (Versuch Nr. 59), so überlebt das Tier die Injektion doppelt so lange als dies bei dem Kontrolltier (Versuch Nr. 56) der Fall ist; es geht zugleich mit der Maus ein, die Toxin und Calcium erhalten hatte (Vers. 57).

Unsere Annahme von der Adsorption des Salzes durch das Immun- und Normal-Serum resp. die Toxin-Antitoxinverbindung erhält durch den Ausfall dieser Versuche eine weitere experimentelle Stütze.

Aus den angeführten Versuchen mit Immunserum ergibt sich die Tatsache, daß das Toxin mit dem Serum in eine gewisse innige Beziehung treten muß, damit es von den Salzen angegriffen werden kann; der analoge Ausfall der Versuche mit normalem Serum legt die Annahme nahe, daß auch hier zwischen Toxin und Serum eine engere Beziehung statthaben muß, die es ermöglicht, daß das Calcium auf diese Toxin-Serummischung anders einwirkt als auf Serum resp. Toxin allein. Es ist denkbar, daß es sich ebenso wie bei der Verbindung Toxin-Antitoxin auch bei dem Gemisch Toxin-Normalserum um analoge Adsorptionsverbindungen handelt, nur daß bei der Neutralisation des Toxins durch Immunserum zu dieser kolloidalen Adsorption noch ein spezifischer Absättigungsvorgang hinzukommt. In beiden Fällen muß es sich aber um eine komplette Adsorption des gesamten Toxins durch das Immun- resp. Normalserum handeln, trotzdem die Mischungen unterneutralisierte sind, da ja sonst ein eventuell ungebunden zurückbleibender Toxinrest, wie sich auf Grund unserer Versuche bei getrenntem Salz- und Toxinzusatz ergibt, der zerstörenden Wirkung des Salzes entzogen und daher toxisch wirksam bleiben müßte.

Wir haben uns demnach die Absättigung von Toxin durch das Immunserum gleichsam in zwei Phasen vor sich gehend zu denken, von denen die eine die kolloidale Adsorption durch das Serumeiweiß ohne Beeinflussung der Toxicität, die andere eine spezifische Neutralisation des Toxins darstellt.

II. Versuche mit Diphtherietoxin.

a) Einwirkung von Salzen mit einwertigem Kation.

In analoger Weise, wie in den Versuchen mit Tetanustoxin, wurde der Einfluß der Salze auf Diphtherietoxin und -Antitoxin untersucht. Auch hier gliederten sich die Versuche in zwei Gruppen, indem das Serum einmal in der Salzlösung

verdünnt und dann dieser Serum-Salz-Mischung das Toxin zugesetzt wurde, während im zweiten Falle das Salz der in physiologischer Kochsalzlösung hergestellten Toxin-Antitoxinverbindung gegenübertrat. Die Provenienz der Sera ist in jedem Versuche angeführt. In den Versuchen mit einwertigen Salzen kam das Toxin „Höchst", und zwar mit der L_+ Dosis = 0,88 ccm, in denen mit Salzen mit zweiwertigem Kation das Toxin „Mac Farland", L_+ Dosis = 0,95 ccm, in Verwendung. Die Auswertung der Immunsera wurde nach der bewährten Methode Ehrlichs an Meerschweinchen in der üblichen Weise vorgenommen; die Menge des zur Injektion verwendeten endgültigen Mischungsgemenges von Antitoxin, Toxin und Salzlösung betrug stets 2 ccm; wenn nötig, wurden die Lösungen zu diesem Volumen mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt.

1. Serum vom Pferde „Laudon", Aderlaß vom 31. XI. 06.

Das Serum war 450fach.

Vers. 1. Serum 450fach in 10%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 18. II. 07
- 19. II. Strang.
- 20. II. hartes, flaches Infiltrat
- 22. II. hartes, flaches Infiltrat
- 24. II. Strang

Vers. 2. Serum 450fach in 30%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 18. II. 07
- 19. II. kl. Infiltrat
- 20. II. hartes Infiltrat
- 21. II. „ „
- 22. II. Knopf
- 24. II. „

Vers. 3. Serum 450fach in physiol. Kochsalzlösung verd., nachträglicher Zusatz von 0,7 ccm 30%iger Ammonsulfatlösung.

Inj. v. 18. II.
- 19. II. Infiltrat
- 20. II. „
- 21. II. hartes, kleines Infiltrat
- 22. II. „ „ „
- 24. II. Infiltrat wird kleiner.

Vers. 4. Serum 450fach in 62%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 27. II. 07
- 28. II. kleines Infiltrat
- 1. III. Strang
- 3. III. „
- 5. III. „

Inj. v. 1. III. 07
- 2. III. kl. Infiltrat
- 3. III. „ „ (nässende Exkoriation)
- 5. III. Infiltrat
- 6. III. Strang

2. Serum vom Pferde „Landsknecht", Aderlaß vom 3. XII. 06.

Bei 250facher Verdünnung bleibt das Tier im Kontrollversuch annähernd glatt.

Vers. 5. Serum 250fach in 30%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 20. II. 07
21. II. Strang
22. II. „
24. II. „
3. III. Knopf

Vers. 6. Serum 250fach in physiol. Kochsalzlösung verd.; nachträglicher Zusatz von 0,8 ccm 30%iger Ammonsulfatlösung.

Inj. v. 25. II. 07
26. II. Strang
28. II. „
1. III. kleines Infiltrat
3. III. kl. hartes Infiltrat

3. Serum vom Pferde „Laertes", Aderlaß vom 31. XII. 06.

Das Serum war 450fach.

Vers. 7. Serum 450fach in 10%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 26. II.
27. II. ∅
28. II. Strang
1. III. „
2. III. Infiltrat
6. III. † (Diphtherietod)

Vers. 8. Serum 500fach in 10%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 26. II. 07
27. II. weiches Infiltrat
28. II. großes weiches Infiltrat
1. III. morgens † aufgefunden (Diphtherietod).

4. Serum vom Pferde „Kurt" Nr. 781.

Eine Auswertung ergab das Serum als 300fach.

Vers. 9. Serum 300fach in 10%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 20. II. 07
21. II. ∅
22. II. Infiltrat
24. II. Strang
27. II. „

5. Serum vom Pferde „Kurt" Nr. 743.

Das Serum war 550fach.

Vers. 10. Serum 480fach in 10%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 3. III. 07
4. III. Strang
5. III. „
7. III. „
10. III. „

6. Serum vom Pferde „Ilsan", Aderlaß vom 2. II. 07.

Das Serum war 300fach.

Vers. 11. Serum 300fach in 1%iger Ammonsulfatlösung verd.

Inj. v. 26. II. 07
27. II. Infiltrat
28. II. großes Infiltrat
2. II. „ „ starke Dyspnoe
3. II. † (Diphtherietod).

Den gleichen negativen Effekt hatte auch die Verwendung anderer Salze mit einwertigem Kation, so Kochsalz in 10%iger Lösung, Ammoniumbromid, Rhodanammonium und Natriumsulfat in derselben Konzentration.

Es ergeben nun diese Versuche in Übereinstimmung mit denen mit Tetanustoxin, daß trotz der höheren Salzkonzentration, deren Verwendung die größeren Versuchstiere gestatteten, die einwertigen Salzionen weder auf das Toxin oder Antitoxin, noch auf die Verbindung beider irgend einen an der Toxicität des Gemisches meßbaren Einfluß ausüben. Besonders bemerkenswert ist es aber, daß selbst Salzkonzentrationen, die hart an der Fällungsgrenze für Globuline stehen, (es kamen bis 60%ige Lösungen in unseren Versuchen zur Verwendung), sich völlig indifferent in obigem Sinne erwiesen.

Diese Resultate verdienen noch von einem anderen Gesichtspunkte Beachtung: Unter den verwendeten Seren befanden sich einige, so die Sera der Pferde „Ilsan" und „Kurt Nr. 743", die bei der Absättigung mit Toxin in physiologischer Kochsalzlösung in hohem Maße das Phänomen der Toxolabilität [Pick und Schwoner (15)] darboten; es schien uns nun nicht unmöglich, daß der Einfluß der Salze sich gerade bei diesen Seren leichter dokumentieren würde, da ihre Veränderlichkeit bei der Bindung des Toxins immerhin erwarten ließ, daß auch bei der Bildung der Salzadsorptionsverbindungen ihr labiler Charakter zum Ausdruck kommen würde. Der Ausfall unserer Versuche zeigte jedoch, daß zwischen toxostabilen und -labilen Seren dem Salze gegenüber kein Unterschied besteht, was die bereits früher ausgedrückte Ansicht bestätigt, daß diese Labilität nur bei einer spezifischen Adsorption durch das Toxin auftritt.

b) Versuche mit Salzen mit zweiwertigem Kation.

7. Serum vom Pferde „Laudon", Aderlaß vom 7. VII. 08.

Ein Auswertungsversuch ergab folgendes Resultat:

Vers. 12. Serum 500fach in physiol. Kochsalzlösung verd.
Inj. v. 9. VII. 08
10. VII. Infiltrat
11. VII. gr. weich. Infiltrat
12. VII. † (Diphtherietod)

Vers. 13. Serum 450fach in physiol. Kochsalzlösung verd.
Inj. v. 9. VII.
10. VII. ∅
11. VII. Strang
13. VII. hartes Infiltrat
18. VII. Strang

Versuche in 10%iger Calciumacetatlösung.

Vers. 14. Serum 500fach in Salzlösung verd.
Inj. v. 11. VII.
12. VII. Infiltrat
13. VII. gr. weich. Infiltrat
14. VII. † (Diphtherietod)

Vers. 15. Serum 450fach in Salzlösung verd.
Inj. v. 11. VII.
12. VII. Infiltrat
13. VII. Nekrose (v. Salz)
18. VII. „
überlebt

Vers. 16. Serum 450 fach, in physiol. Kochsalzlösung verd., mit nachträglichem Salzzusatz.
Inj. v. 22. VII.
24. VII. Infiltrat
26. VII. große Nekrose (v. Salz)
28. VII. große Nekrose
überlebt

Versuche in 10%iger Magnesiumsulfatlösung.

Vers. 17. Serum 500fach in Salzlösung verd.
Inj. v. 11. VII.
12. VII. Infiltrat
13. VII. gr. weich. Infiltrat; abds. † (Diphtherietod)

Vers. 18. Serum 450fach in Salzlösung verd.
Inj. v. 13. VII.
14. VII. Infiltrat
16. VII. gr. hart. Infiltrat
20. VII. Nekrose (v. Salz)
22. VII. „
überlebt

Vers. 19. Serum 450 fach, in physiol. Kochsalzlösung verd., mit nachträglichem Salzzusatz.
Inj. v. 22. VII.
24. VII. kleines Infiltrat
25. VII. hartes „
27. VII. Nekrose
überlebt

Diese Versuche, die als Beispiele aus einer großen Zahl analoger Untersuchungen herausgegriffen sind, zeigen übereinstimmend, daß Calcium- und Magnesiumsalze, die wir bei den Versuchen mit Tetanustoxin in allerdings viel geringeren Salzkonzentrationen als Repräsentanten zwei verschiedener Wirkungstypen kennen gelernt haben, in analoger Versuchsanordnung auf Diphtherietoxin und -Antitoxin gar keine Wirkung zeigen. Zu bemerken ist noch, daß die geringfügigen Differenzen, die sich zwischen Versuchstieren und Kontrolltieren in den Protokollen finden, wie Nekrosen, Infiltrate u. dgl., eher auf Kosten der Salzwirkung an der Injektionsstelle zu setzen sind, als daß sie Ausdruck einer veränderten spezifischen Toxicität des Gemisches wären.

Diese unsere Ergebnisse mit Tetanus- und Diphtherietoxin stehen in guter Übereinstimmung mit anderweitigen Erfahrungen, die zeigen, daß zwischen dem Verhalten dieser beiden Toxine

in physikalisch-chemischer Beziehung große Unterschiede bestehen. So hatte sich auf Grund der Versuche von Roux und Yersin (16), Morgenroth (17), Doerr (18) gezeigt, daß das Diphtherietoxin-Antitoxingemisch durch Säure leicht dissoziiert wird, während eine ähnliche Restitution des Tetanustoxins aus seiner Antitoxinbindung nicht nachgewiesen werden konnte.

Schlußsätze.

Die vorstehenden Versuche gestatten einen Einblick in die gegenseitigen Beziehungen von Toxin und Antitoxin, indem sie zeigen, daß sich die Reaktion zwischen Toxin und Immunserum, sowie Toxin und Normalserum durch Einwirkung der Salze auf die Serum-Eiweiß-Kolloide bis zu einem gewissen Grade beeinflussen läßt. Es ist sohin möglich, daß auch in der lebenden Zelle das Toxin ähnlichen Einflüssen ausgesetzt ist und daß die Aufnahme gewisser eiweißartiger Gifte (Tetanustoxin) im Organismus zum Teile beherrscht wird von den physikalisch-chemischen Gesetzen über die Salz-Eiweiß-Verbindungen. Im besonderen ergibt sich:

1. Die untersuchten Salze mit einwertigem Kation, wie NaCl, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO$, NH_4SCN, NH_4Br, welche weder Diphtherie-, noch Tetanustoxin zerstören, greifen diese Gifte auch bei Anwesenheit von Serumeiweiß nicht an und üben auf die spezifische Bindungsfähigkeit von Toxin und Antitoxin selbst in relativ hohen Konzentrationen keinen Einfluß, so daß der Bindungsprozeß von dem Salzmilieu in weitem Umfange unabhängig ist; auch die gefestigte Verbindung von Toxin und Antitoxin wird von diesen Salzen nicht beeinflußt.

2. Vor der zerstörenden Wirkung von Calcium- und Aluminiumionen wird das Tetanustoxin durch die Gegenwart von Immunserum geschützt, während es in der Verbindung mit Antitoxin von diesen Salzen mehr oder weniger angegriffen wird, und zwar um so intensiver, je gefestigter diese Verbindung ist.

3. Magnesiumsalze zeigen das umgekehrte Verhalten, da das Magnesiumion seine zerstörende Wirkung auf das Tetanustoxin gerade dann ausübt, wenn das Toxin erst der Serum-Salzmischung zugefügt wird, während bei der Einwirkung des Salzes auf die gefestigte Toxin-Antitoxinverbindung

kein Einfluß bemerkbar ist. Ein ähnlicher Antagonismus von Calcium und Magnesium zeigt sich auch in anderen biologischen Prozessen (J. Loeb u. a.).

4. Die Beobachtung, daß die Gegenwart von Serum das Toxin vor der Einwirkung gewisser Salzionen (Ca, Al) schützt, legt die Annahme einer Eiweiß-Salz-Adsorptionsverbindung nahe, die freiem oder locker gebundenem Toxin gegenüber indifferent ist; andererseits führt die Einwirkung von Calcium- resp. Aluminiumsalzen auf die gefestigte Toxin-Antitoxinverbindung zur Bildung einer Toxin-Antitoxin-Salzverbindung, die eine erheblich geringere Toxicität besitzt als die Toxin-Antitoxinverbindung an und für sich.

5. In analoger Versuchsanordnung übt die Verbindung Normalserum-Calcium resp. Normalserum-Toxin-Calcium dieselbe Wirkung auf Tetanustoxin aus wie die Systeme Immunserum-Calcium resp. Immunserum-Toxin-Calcium.

6. Die Resultate dieser Versuche nötigen zu der Annahme, daß der Neutralisationsvorgang Toxin-Immunserum in zwei Phasen vor sich geht: zunächst in der Phase der kolloidalen Adsorption und dann in der der spezifischen Absättigung des Toxins. Die erste Phase tritt auch im Normalserum ein. In beiden Fällen wird das gesamte Toxin vom Serum adsorbiert.

7. Ein- und zweiwertige Salze lassen in den untersuchten Konzentrationen weder auf das Diphtherietoxin oder Antitoxin allein, noch auf die gefestigte Verbindung beider irgend einen Einfluß erkennen.

Literatur.

1. Hofmeister, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 24 bis 28.
2. Buchner, Arch. f. Hygiene 1893, 138.
3. Bordet, Annal. Pasteur 1899, 225.
4. Joos, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 40 und 36.
5. Friedberger, Centralbl. f. Bakt. 30, Nr. 8, 1901.
6. Porges, Centralbl. f. Bakt. 1905, 135.
7. Shibayama, Centralbl. f. Bakt. 1901, 760.
8. Ehrlich u. Sachs, Berl. klin. Wochenschr. 1902, Nr. 2.
9. Markl, Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 39, 1902.
10. Ferrata, Berl. klin. Wochenschr. 1907, 366.
11. Sachs u. Teruuchi, Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 16, 17, 19.

12. Knorr, Münch. med. Wochenschr. 1898, 321 u. 362.
13. Přibram, Wiener klin. Wochenschr. 1908.
14. Levaditi u. Yamanouchi, Compt. rend. 65, 1908.
15. Pick u. Schwoner, Wiener klin. Wochenschr. 1904 u. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1, 1905.
16. Roux u. Yersin, Annales de l'Inst. Pasteur 3, 273, 1889.
17. Morgenroth, Berl. klin. Wochenschr. 1905, Nr. 50; ferner Morgenroth u. Pane, diese Zeitschr. 1, 354, 1906.
18. Doerr, Wiener klin. Wochenschr. 1907, 5.
19. Landsteiner u. v. Eisler, Centralbl. f. Bakt. 39, 1905 u. Landsteiner u. Botteri, daselbst 42, 1906.
20. Takaki, Kenji, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 288, 1908.
21. Mayer, André u. Terroine, Compt. rend. 1907, 398.
22. Höber, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 35, 1908.
23. Porges u. Neubauer, diese Zeitschr. 7, 152, 1907.
24. Landsteiner u. Raubitschek, diese Zeitschr. 15, 33, 1908.
25. Pauli u. Handowski, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 415, 1908.
26. Breinl u. Nierenstein, Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Ther. 1909, Heft 5.

Die Einwirkung von Alkalisalzen auf das Flimmerepithel.

Von

Rudolf Höber

(nach gemeinsam mit M. Iwaschkiewitsch ausgeführten Versuchen).

(Aus den physiologischen Instituten von Zürich und Kiel).

(Eingegangen am 26. März 1909.)

Mit 2 Figuren im Text.

Durch meine Untersuchungen über die physiologischen Wirkungen der Alkalisalze und anderer Neutralsalze vom Typus der Alkalisalze[1]) sah ich mich veranlaßt, die in der Literatur vorhandenen Angaben über den Einfluß dieser Salze auf die Flimmerbewegung durchzusehen, und da ich fand, daß die betreffenden Angaben bei den verschiedenen Autoren recht widersprechend lauten, so habe ich zusammen mit M. Iwaschkiewitsch diesen Einfluß von neuem untersucht.

Bevor ich über unsere Ergebnisse berichte, sei kurz mitgeteilt, an welche der älteren Versuche wir anzuküpfen hatten. Wir haben nämlich nur diejenigen Untersuchungen fortgeführt, in denen es sich um die Einwirkung reiner Alkalisalzlösungen handelt, während die Prüfung von Salzgemischen vorläufig von uns gar nicht berücksichtigt wurde. Wenn man das Ziel verfolgt, festzustellen, welche Salzbestandteile unbedingt in dem Medium, in dem die Flimmerzellen arbeiten, vorhanden sein müssen, und welches ferner diejenigen Konzentrationen der notwendigen Salze sind, bei denen die Flimmerarbeit normal ausgeführt wird, dann wird man allerdings auf die Untersuchung

[1]) Pflügers Archiv 106, 599, 1905. — Centralbl. f. Physiol. 19, 390, 1905. — Pflügers Archiv 120, 492, 1907. — Diese Zeitschr. 14, 209, 1908. — Pflügers Archiv 126, 331, 1909.

aller möglicher Salzgemische angewiesen sein. Und in der Tat ist man ja auch so bei entsprechenden Fragestellungen schon oft verfahren, von den Versuchen der Botaniker zur Auffindung geeigneter Nährsalzlösungen und von den Versuchen Ringers und Lockes über die Erregbarkeit der Muskeln und Nerven angefangen bis zu den zahlreichen Experimenten der neueren Zeit über den Einfluß der Salze auf die Entwicklung und das Gedeihen von Meerestieren, auf den rhythmischen Schlag des Herzens und das rhythmische Pulsieren der Medusen, und anderes. Geht man aber darauf aus, für die Salzwirkungen eine Erklärung zu finden, d. h. die physiologischen Salzwirkungen an die physikalischen und chemischen Wirkungen gelöster Salze anzuknüpfen, dann erscheint es von vornherein aussichtsvoller, und hat sich, wie mir scheint, auch wirklich als zweckmäßig erwiesen, wenn man unphysiologischer verfährt und die reinen Salzlösungen zur Wirkung bringt.

In dieser Weise ist das Flimmerepithel bisher nur von drei Autoren untersucht worden, von G. Weinland unter Grützners[1]) Leitung, von S. S. Maxwell[2]) und von Ralph S. Lillie[3]), und zwar suchten alle drei zunächst die einfachste Frage zu lösen, nämlich die Frage, welchen Einfluß die reinen Salzlösungen auf die Dauer der Flimmerarbeit ausüben.

Weinland benutzte bei seinen Untersuchungen das klassische Objekt der Rachenschleimhaut vom Frosch, aus der er kleine, benachbart gelegene Stückchen herausschnitt; die Schlagfähigkeit der Epithelien am Rand dieser Stückchen wurde dann kurz in 0,6 %iger Kochsalzlösung unter dem Mikroskop geprüft, und wenn die Stücke vergleichbare Beweglichkeit zeigten, dann wurden sie in $^{n}/_{8}$-Lösungen der Alkalisalze übertragen und nun weiter beobachtet. In dieser Weise stellte Weinland fest, daß 1. die Jodide von Natrium und Kalium den Flimmerschlag rascher aufheben als die Bromide und diese wieder rascher als die entsprechenden Chloride, daß 2. Caesiumchlorid schädlicher ist als Rubidiumchlorid und Rubidiumchlorid schädlicher als Kaliumchlorid, und daß 3. Natriumsalze weniger günstig für das Flimmern sind als Kaliumsalze und diese wieder

[1]) Pflügers Archiv 58, 105, 1894.

[2]) American Journ. of Physiol. 13, 154, 1905.

[3]) American Journ. of Physiol. 17, 89, 1906; auch 10, 419, 1904.

den Ammoniumsalzen nachstehen. Die Ergebnisse sind also durch folgende drei Reihen kurz zur Darstellung zu bringen:

$$J > Br > Cl,$$
$$Cs > Rb > K,$$
$$Na > K > NH_4.$$

Nun ist es natürlich von Interesse, zu wissen, in welchem Verhältnis die beiden Kationenreihen zueinander stehen; es wäre dazu vor allem notwendig, zu wissen, wie sich die Wirkungen von Na, Rb und Cs zueinander verhalten. Derartige Vergleiche scheint Weinland aber nicht vorgenommen zu haben; immerhin ist aus seinen schematischen Kurven für die Abhängigkeit der Stärke des Flimmerns in den verschiedenen Lösungen von der Zeit zu entnehmen, daß er eine Reihe:

$$Cs > Rb > Na > K > NH_4$$

als maßgebend für die Abstufung der Kationenwirkungen ansieht.

Auch Maxwell verwendete das Rachenepithel vom Frosch, methodisch ging er aber anders vor als Weinland. Erstens benutzte er nicht stark hypertonische Lösungen, wie Weinland, sondern als annähernd isotonische Lösungen Lösungen von 0,125 Normalität. Zweitens verfuhr er auch bei der Beurteilung der Schlagdauer der Epithelien anders als Weinland. Er führte zwei Reihen von Versuchen aus; in der einen wurde nach der Methode von Bowditch die mechanische Arbeit gemessen, welche die auf einer schiefen Ebene ausgespannte Rachenschleimhaut zu leisten vermochte, indem ihre Zellen ein kleines Gewicht die Ebene aufwärts transportierten, und zwar wurde zuerst nach ganz kurzer Bespülung mit einer der Lösungen die Zeit festgestellt, in welcher das Gewicht über eine bestimmte Weglänge befördert wird, dann wurde die für die gleiche Leistung notwendige Zeit nach einstündigem Verweilen der Schleimhaut in der Lösung bestimmt, und nach 4- und 24stündigem Verweilen wurden die betreffenden Zeiten dann nochmals gemessen. Für die Einwirkung der verschiedenen Salze auf die Dauer der Arbeitsfähigkeit der Rachenschleimhaut kam Maxwell so zu folgendem Ergebnis: von den Lösungen der Chloride von Lithium, Natrium, Kalium und Ammonium erhält allein die NaCl-Lösung noch nach 4 Stunden Einwirkung die Leistungsfähigkeit auf einer meßbaren Höhe, die KCl-Lösung konserviert ebenso lange

nur noch eine Spur des Arbeitsvermögens in der Hälfte der Fälle, die NH_4Cl-Lösung leistet dasselbe noch seltener, während die LiCl-Lösung oft schon nach 1 Stunde Einwirkung die Schleimhaut leistungsunfähig macht. Maxwell gelangt also auf diese Weise zu der Kationenreihe:

$$Li > NH_4 > K > Na.$$

Seine zweite Versuchsreihe ist methodisch eher mit der Untersuchung von Weinland zu vergleichen. Hier zerlegte Maxwell die Rachenschleimhaut eines Frosches in mehrere Stücke, jedes Stück kam in eine der Lösungen, und davon wurden dann von Zeit zu Zeit kleine Stücken abgeschnitten, und unter dem Mikroskop nachgesehen, ob die Cilien noch schlagen. Maxwell fand dabei folgende Schlagdauern:

LiCl	25—35	Stunden
NH_4Cl	20—33	„
NaCl	40—60	„
KCl	25—30	„

Diesmal kommt Maxwell also zu der Kationenreihe:

$$NH_4, K > Li \gg Na;$$

Li ist also ein wenig günstiger als NH_4 und K, während es sich in der ersten Versuchsreihe als dem NH_4 und K stark unterlegen gezeigt hatte.

Bei den Untersuchungen von Lillie handelt es sich um den Salzeinfluß auf die Cilienbewegung bei Meerestieren; von solchen wurden teils die bewimperten Larven von Arenicola, teils Muscheln, besonders Mytilus edulis verwendet, deren Kiemen das Flimmerepithel lieferten. Genauere Untersuchungen mit reinen Salzlösungen wurden nur an den Muschelkiemen ausgeführt. Bei diesen wurde der Flimmersaum in die gewöhnlich mit dem Meerwasser annähernd isotonischen Lösungen eingetaucht und dann ab und zu nachgesehen, ob die Cilien noch schlagen. Lillie fand, daß LiCl und NaCl oft fast momentan lähmen, aber das LiCl doch noch rascher als das NaCl. Andrerseits erhält sich der Schlag ausgezeichnet in vielen Kalisalzlösungen. Weniger günstig ist RbCl, noch weniger CsCl, und diesem stehen die Ammonsalze nahe. Alle drei Kationen Rb, Cs und NH_4 sind aber doch, ebenso wie das K, für die Wimper-

bewegung günstiger als Li und Na. Lillie kommt demnach für die Kationen zu der Reihe:

$$Li > Na > Cs,\ NH_4 > Rb > K.$$

Die wichtigsten der von ihm in Natrium-, Kalium- und Ammoniumsalzen verwendeten Anionen bilden die Reihe:

$$SCN > J > Br,\ NO_3,\ SO_4,\ \text{Tartrat} > Cl,\ \text{Acetat}.$$ —

Rekapitulieren wir nun kurz, so wurden also folgende Kationenreihen aufgestellt:

$Cs > Rb > Na > K > NH_4$	(Weinland)
$Li > NH_4 > K > Na$	(Maxwell)
$NH_4,\ K > Li \gg Na$	(Maxwell)
$Li > Na > Cs,\ NH_4 > Rb > K$	(Lillie).

Von einer Übereinstimmung kann also keine Rede sein.

In den Anionenreihen dagegen herrscht, soweit sich zwischen den Untersuchungen von Weinland und Lillie der Vergleich führen läßt, Übereinstimmung; denn beide Male findet sich die Reihe:

$$J > Br > Cl.$$

Wir werden nun danach zu sehen haben, woran es liegen kann, daß die Kationenwirksamkeit so sehr verschieden beurteilt wurde. Einen Widerspruch wollen wir gleich lösen, nämlich den zwischen den beiden von Maxwell aufgestellten Reihen. Die noch bleibenden Widersprüche sollen dann erst später erörtert werden.

Die von Maxwell zur Beobachtung der Schlagdauer des Flimmerepithels verwendete Methode der Messung der Arbeitsleistung ist offenbar für ihren Zweck ungeeignet, sobald entweder der Flimmerschlag unter der Wirkung eines Salzes seine ganze Koordination einbüßen kann, oder sobald die Flimmerzellen ihren Halt verlieren können, indem sie sich mehr oder weniger von ihrer Unterlage ablösen; in beiden Fällen ist es möglich, daß der Schlag jeder einzelnen Zelle von normaler Stärke ist, und daß trotzdem von der Gesamtheit der Zellen gar keine Arbeit geleistet wird. Der erste Fall kommt nun sehr wahrscheinlich, der zweite bestimmt vor; — dies letztere hat übrigens Maxwell auch schon selber hervorgehoben. Darum kann die Methode, ganz abgesehen von anderen Fehlerquellen, keine zuverlässigen Resultate geben, und damit entfällt

die einzige Versuchsreihe, deren Ergebnisse durch eine objektive Messung gewonnen sind, für die weitere Verwertung.

Aber auch die primitive und subjektive Methode, mit deren Hilfe die übrigen Ionenreihen aufgestellt sind, läßt sehr leicht Irrtümer in der Abschätzung zu. Es scheint uns jedoch, daß diese genügend vermieden werden können. Jedenfalls haben auch wir uns dieser Methode bedient und wollen nun mitteilen, zu welchen Ergebnissen wir damit gekommen sind.

Versuche.

A. Methodik. Zu unseren Versuchen haben auch wir die Rachenschleimhaut vom Frosch, vorwiegend von R. temporaria verwendet. Wir entnahmen davon Teile stets unmittelbar nach dem Töten, meist zwei oder auch drei benachbarte, möglichst quadratische Stücke von etwa 3 bis 4 mm Seitenlänge, deren Ränder durch Schneiden mit einer scharfen Schere möglichst glatt gebildet wurden. Jedes der Stücke wurde sofort für einige Minuten in eine der Lösungen gelegt, deren Wirkung beobachtet werden sollte; dann nach dieser Spülung kamen die Stücke zur weiteren Prüfung in Kammern. Diese waren folgendermaßen hergestellt: in große Deckgläser wurden mit Hilfe von Flußsäure Löcher von 12 bis 15 mm Durchmesser geätzt, und 2 bis 3 solcher Gläser wurden mit Canadabalsam übereinander auf einen Objektträger geklebt. In der so gebildeten Kammer wurden die Schleimhautstückchen vorsichtig mit Nadeln ausgebreitet, die Kammern mit denselben Lösungen, die zur Spülung gedient hatten, gefüllt, und, ohne daß eine Luftblase mit eingeschlossen wurde, mit Deckgläsern zugedeckt. Darauf wurde ein Paraffinrahmen gezogen.

Jedes der Präparate wurde dann sofort zuerst flüchtig im Mikroskop betrachtet, um einen Gesamteindruck vom Flimmerschlag zu erhalten, und dann längere Zeit genauer durchgesehen.

Weinland verfuhr so, daß er jedes Schleimhautstück nach dem Ausschneiden zunächst in 0,6 $^0/_0$ige NaCl-Lösung überführte und sich erst im Mikroskop davon überzeugte, daß die Schlagfähigkeit gut beschaffen war, bevor er in die eigentliche Versuchslösung weiter übertrug. Dies schien uns nicht zweckmäßig; erstens muß dann das Stückchen zweimal ausgebreitet werden, wird also doppelt so stark mitgenommen, wie so schon

bei dieser Prozedur; zweitens ist eine reine Kochsalzlösung, wie wir sehen werden, weit entfernt davon, indifferent zu sein, und davon ist drittens die Folge, daß wir nach Kochsalzbehandlung nicht das reine Bild des Einflusses der gerade wirkenden Lösung erhalten können.

Bei der längeren Beobachtung der fertiggestellten Präparate haben wir nun nicht bloß darauf acht gegeben, wie lange nach dem Versuchsbeginn der letzte Flimmerschlag erfolgt; es tellte sich bald heraus, daß die Art, wie die Bewegung erlischt, bei der Wirkung der verschiedenen Alkalisalze sehr verschieden ist. Will man aber von dieser Art des Abklingens in der Tätigkeit der gesamten sichtbaren Epithelien einen Eindruck gewinnen, so ist das nicht ganz leicht. Man kann nicht das ganze Schleimhautstück bei der notwendigen Vergrößerung auf einmal überblicken, muß vielmehr fortwährend verschieben und sich so ein Bild machen, das man mit dem zweiten, eventuell auch dritten Präparat vergleichen kann. Die Methode, mit welcher die Ergebnisse zu gewinnen sind, ist also in höchstem Maße subjektiv; dennoch halten wir sie für vertrauenswürdig, wenn man nur mit Geduld die Präparate immer wieder miteinander vergleicht und dann durch Häufung solcher Versuche die eben genannten und die sich aus der Präparation und der Einbettung ergebenden Unvollkommenheiten zu eliminieren sucht.

In dieser Art haben wir nun wesentlich zwei Versuchsreihen durchgeführt; in der einen behandelten wir das Flimmerepithel mit 4- bis 5fach isotonischen Lösungen, dabei erlischt der Cilienschlag ziemlich rasch, und man erhält ziemlich leicht einen Eindruck von dem relativen Einfluß der Ionen auf die Schlagdauer; in der zweiten Versuchsreihe verwendeten wir isotonische Lösungen, unter deren Wirkung treten mehr die qualitativen Differenzen im Flimmern hervor.

B. Der Einfluß der Alkali-Kationen in hypertonischer Lösung. Mit Rücksicht auf die eben gemachten Bemerkungen über die Methodik der Untersuchung scheint es uns notwendig, durch Wiedergabe von Protokollen einen Einblick in den Verlauf unserer Versuche zu geben; es sei aber betont, daß wir hier nur einen kleinen Teil der Protokolle, aus denen wir unsere Schlüsse gezogen haben, veröffentlichen.

1. 6,74 % Caesiumchlorid und 3,3 % Kaliumchlorid (19. V. 1908.)

a) 6,74 % CsCl: An den meisten Stellen von Anfang an Stillstand oder nur zuckende Bewegung, an vereinzelten ziemlich lebhafte Bewegung. Nach 20 bis 25 Minuten überall Stillstand.

b) 3,3 % KCl: An mehreren Stellen von Anfang an Stillstand, an den meisten lebhafte Bewegung, die noch nach 1 Stunde vorhanden ist.

Resultat: CsCl > KCl.

2. 6,74 % Caesiumchlorid und 2,6 % Natriumchlorid (16. V. 1908).

a) 6,74 % CsCl: In den ersten 10 bis 15 Minuten an den meisten Stellen Stillstand oder langsame, stoßartige Bewegung, an mehreren lebhafte Bewegung. Nach 20 Minuten fast überall allmählich eingetretener Stillstand. Nach 25 Minuten überall Ruhe.

b) 2,6 % NaCl: In den ersten 15 bis 20 Minuten an den meisten Stellen lebhafte Bewegung, an mehreren Stillstand. Nach 75 Minuten vielfach noch lebhafte Bewegung.

Resultat: CsCl > NaCl.

3. 6,74 % Caesiumchlorid und 5,4 % Rubidiumchlorid (21. V. 1908).

a) 6,74 % CsCl: In den ersten 5 Minuten meistenteils zuckende, absterbende Bewegung oder Stillstand. Nach 20 Minuten überall allmählich eingetretener Stillstand. Epithel gut konserviert, die Cilien liegen gesenkt.

b) 5,4 % RbCl: Nur an vereinzelten Stellen oder zu Anfang Stillstand, an den meisten lebhafte Bewegung. Nach 60 Minuten an wenigen Stellen ziemlich lebhafte Bewegung, sonst Stillstand. Nach 75 Minuten überall Stillstand.

Resultat: CsCl > RbCl.

4. 6,74 % Caesiumchlorid und 1,89 % Lithiumchlorid (26. V. 1908).

a) 6,74 % CsCl: In den ersten 3 bis 5 Minuten an mehreren Stellen Stillstand, an den übrigen zuckend erlöschende Bewegung, die innerhalb 25 Minuten ganz allmählich verschwindet.

b) 1,89 % LiCl: In den ersten 5 Minuten an den meisten Stellen Stillstand, an vereinzelten lebhafte Bewegung. Nach 15 Minuten ist auch an diesen der Stillstand rasch eingetreten. Epithel gut konserviert, die Ciilen stehen senkrecht zur Oberfläche.

Resultat: LiCl > CsCl.

5. 2,6 % Natriumchlorid und 3,3 % Kaliumchlorid (2. VI. 1908).

a) 2,6 % NaCl: An den meisten Stellen zunächst lebhafte Bewegung. Nach 30 Minuten an der Hälfte des Randes Stillstand, an der anderen lebhafte Bewegung. Nach 80 Minuten überall Stillstand.

b) 3,3 % KCl: An den meisten Stellen zunächst lebhafte Bewegung. Nach 30 Minuten zur Hälfte Stillstand. Nach 80 Minuten an verein-

zelten Stellen lebhafte Bewegung. Nach 2 Stunden an einer einzigen Stelle noch ziemlich lebhafte Bewegung.

Resultat: NaCl > KCl.

In anderen Versuchen war öfters der Unterschied zwischen NaCl und KCl nicht so deutlich, aber meistens konserviert doch KCl den Flimmerschlag länger als NaCl.

6. 5,4 % Rubidiumchlorid und 3,3 % Kaliumchlorid (21. V. 1908).

a) 5,4 % RbCl: An vereinzelten Stellen von Anfang an Stillstand, an den meisten lebhafte Bewegung, die allmählich abnimmt, bis nach 90 Minuten meistenteils Stillstand herrscht. Nach 1 Stunde 50 Minuten steht alles still.

b) 3,3 % KCl: An vereinzelten Stellen gleich Stillstand, an den meisten lebhafte Bewegung, die sich allmählich verringert. Nach 90 Minuten war noch an ganz wenigen Stellen ziemlich lebhafte Bewegung. Nach 1 Stunde 55 Minuten überall Ruhe.

Resultat: RbCl ≧ KCl.

Auch zwischen RbCl und KCl fanden wir nur einen geringfügigen Unterschied, meist erwies sich aber doch das KCl als etwas günstiger.

7. 2,4 % Ammoniumchlorid und 3,3 % Kaliumchlorid (12. VI. 1908).

a) 2,4 % NH_4Cl: An den meisten Stellen zunächst außerordentlich lebhafte, etwas zitternde Bewegung. Nach 1 Stunde fast überall Stillstand, nur noch an mehreren Stellen zuckende Bewegungen in langsamem Tempo.

b) 3,3 % KCl: Meistens lebhafte Bewegung, die sich im Verlauf von 1 Stunde verlangsamt und an mehreren Stellen in Ruhe übergeht. Nach 2 Stunden an einzelnen Stellen noch langsame Bewegung.

Resultat: NH_4Cl > KCl.

8. 2,4 % Ammoniumchlorid und 2,6 % Natriumchlorid (6. VI. 1908).

a) 2,4 % NH_4Cl: Fast überall besonders schöne Bewegung. Nach 40 Minuten fast überall Stillstand bis auf zwei kleine Stellen, an denen in langsamem Tempo zuckende Bewegungen erfolgen. Nach 60 Minuten überall Stillstand.

b) 2,6 % NaCl: Meistenteils zu Anfang lebhafte Bewegung, an mehreren Stillstand. Nach 30 Minuten an vielen Stellen Stillstand, an mehreren lebhafte Bewegung. Nach 60 Minuten an einigen Stellen noch Bewegung.

Resultat: NH_4Cl > NaCl.

Durch die angeführten und viele andere Versuche kamen wir zu folgender Ansicht: **Hinsichtlich der Wirkung auf die Dauer des Flimmerschlages kann man die untersuchten Chloride in zwei Gruppen einteilen, die eine**

wird von LiCl und CsCl, die andere von NaCl, KCl und RbCl gebildet; die erste Gruppe wirkt auf den Flimmerschlag weit ungünstiger als die zweite. Eine vermittelnde Stellung zwischen beiden Gruppen nimmt NH_4Cl ein. Die einzelnen Glieder der beiden Gruppen unterscheiden sich in ihrer Wirkung nur wenig voneinander. Immerhin haben wir aus der Gesamtheit unserer Versuche mit den hypertonischen Chloridlösungen den Eindruck gewonnen, daß die Kationen sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Schlagdauer in die folgende Reihe ordnen:

$$\mathrm{Li} \geqq \mathrm{Cs} \gg \mathrm{NH_4} \gg \mathrm{Na, Rb} > \mathrm{K}.$$

C. Der Einfluß der Alkalichloride in isotonischer Lösung. Der Gehalt der verwendeten Lösungen war äquivalent mit 0,65 % NaCl.

9. 0,47 % Lithiumchlorid, 1,87 % Caesiumchlorid und 0,83 % Kaliumchlorid (13. VI. 1908).

a) 0,47 % LiCl: In den ersten 5 bis 10 Minuten sehr schöne Strömung erzeugende Bewegung. Nach 15 bis 20 Minuten an den meisten Stellen plötzlich eingetretener Stillstand. Nach 25 Minuten überall Stillstand der gut konservierten, senkrecht zum Rand stehenden Cilien.

b) 1,87 % CsCl: In den ersten 10 bis 15 Minuten an den meisten Stellen rasche Bewegung. Nach 30 bis 40 Minuten allmählich eingetretener Stillstand. Die Cilien liegen wie geknickt.

c) 0,83 % KCl: Überall sehr schöne stromerzeugende Bewegung. Nach 45 Minuten tritt allmählich Stillstand an der Hälfte des Präparates ein. Nach 60 Minuten war an vereinzelten Stellen noch langsame Bewegung.

Wir wollen gleich an die Wiedergabe dieses ersten Protokolls über einen Versuch mit Verwendung isotonischer Lösungen eine auch für die weiterhin angeführten Versuche zutreffende Bemerkung anknüpfen. Während der Vergleich der Salzwirkungen bei Verwendung der vierfach isotonischen Lösungen evidente Resultate eigentlich nur für die Dauer des Flimmerschlages geliefert hat, gelingt es, beim Einfluß der isotonischen Lösungen auch noch Differenzen in der Qualität des Schlages festzustellen. Das eben angeführte Protokoll zeigt das typisch. Die Beobachtung ergab, daß in der LiCl-Lösung zu Anfang eine rasche Bewegung der Cilien herrschte, welche in ihrer Geschwindigkeit und Stärke der Bewegung in der KCl-Lösung nichts nachgab; in der CsCl-Lösung war aber die Bewegung von Anfang

an sichtlich langsamer als bei den beiden anderen. Während nun aber in der Lösung von KCl ebenso wie in der Lösung von CsCl die Schnelligkeit des Schlages sich allmählich verringerte, um freilich in der CsCl-Lösung viel früher zu erlöschen als in der KCl-Lösung, sistierte in der LiCl-Lösung die sehr rasche Bewegung plötzlich. Dies Ergebnis läßt sich also bloß hinsichtlich der Wirkung auf die Schlagdauer durch die einfachen Zeichen

$$LiCl > CsCl > KCl$$

ausdrücken. Die Qualitätsunterschiede bedürfen eher einer graphischen Wiedergabe, welche etwa folgendermaßen aussehen dürfte:

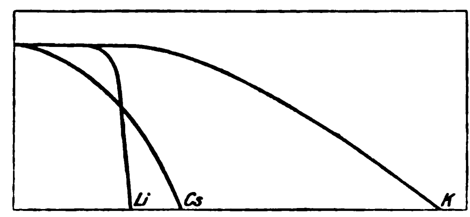


Fig. 1.

10. 0,47 % Lithiumchlorid, 1,87 % Caesiumchlorid und 0,65 % Natriumchlorid (16. X. 1908).

a) 0,47 % LiCl: In der Hälfte des Stückes gleich Stillstand, in der andern Hälfte lebhafte Bewegung. Nach 15 Minuten überall brüsker Stillstand.

b) 1,87 % CsCl: An den meisten Stellen ziemlich lebhafte Bewegung, hier und da Stillstand. Nach 15 Minuten in der einen Hälfte des Präparates Stillstand, in der anderen verlangsamte, stellenweise auch noch rasche Bewegung. Nach 30 Minuten an den meisten Stellen Stillstand, an mehreren sehr verlangsamte Bewegung.

c) 0,65 % NaCl: Zuerst überall schöne stromerzeugende Bewegung. Nach 15 Minuten an mehreren Stellen rascher Stillstand, nach 30 Minuten an vielen, nach 1 Stunde an den meisten Stellen Stillstand.

Die Art, wie durch diese drei Salze die Schlagform beeinflußt wird, wies wieder recht charakteristische Unterschiede auf. Beim CsCl setzt, wie ja schon gesagt wurde, von Anfang an eine allmähliche Verschlechterung der Flimmertätigkeit ein; beim LiCl erlischt dagegen der Schlag nach einem kurzen Stadium großer Lebhaftigkeit ganz rasch. Ähnlich wie beim LiCl ist es nun beim NaCl, nur daß hier an verschiedenen Stellen das brüske Aufhören des Flimmers nach verschiedenen Zeiten ein-

setzt, so daß **im ganzen genommen das Flimmern sich ziemlich rasch verschlechtert, während es an vereinzelten Stellen lange persistieren kann.** Wollte man dies Verhalten graphisch ausdrücken, so müßte man eine ganze Anzahl von NaCl-Kurven ziehen, von denen jede das Verhalten einer anderen Strecke des beobachteten Epithelrandes repräsentiert, und welche sämtlich ungefähr den in Figur 1 gezeichneten Verlauf der LiCl-Kurve nähmen, nur daß der horizontale Ast bei allen den NaCl-Kurven verschieden lang wäre, — freilich im allgemeinen nicht sehr verschieden, nur einige Kurven verliefen bloß auf eine kurze Strecke und einige wenige ziemlich weit horizontal.

11. 0,83 % Kaliumchlorid, 0,65 % Natriumchlorid und 1,87 % Caesiumchlorid (14. VI. 1908).

a) 0,83 % KCl: Anfangs fast überall schöne stromerzeugende Bewegung. Nach 45 Minuten ist nur an einigen Stellen Stillstand eingetreten. Nach 60 Minuten überwiegend Ruhe, an mehreren Stellen noch ziemlich lebhafte Bewegung. Nach 1 Stunde 30 Minuten fast überall Stillstand, nur an vier Stellen noch verlangsamter Schlag. Nach 1 Stunde 50 Minuten überall Ruhe.

b) 0,65 % NaCl: Zuerst fast überall ausgezeichnete stromerzeugende Bewegung. Nach 45 Minuten schon an zwei Dritteln des Randes Stillstand. Nach 1 Stunde 30 Minuten überall Ruhe.

c) 1,87 % CsCl: Nach 5 bis 10 Minuten an mehreren Stellen noch langsame Bewegung. Nach 20 Minuten überall Ruhe. Epithel gut konserviert, Cilien liegen gesenkt.

Die Wirkung auf die Schlagdauer ergibt also die Reihe CsCl > NaCl > KCl >. In KCl und CsCl allmähliche, in NaCl brüske Verschlechterung der Tätigkeit der einzelnen Epithelien.

12. 0,83 % Kaliumchlorid, 0,65 % Natriumchlorid und 0,59 % Ammoniumchlorid (16. X. 1908).

a) 0,83 % KCl: Meistenteils anfangs ziemlich rasche Bewegung, an mehreren Stellen besonders lebhafte Bewegung, an anderen Stillstand. Nach 15 Minuten hat sich die Bewegung verlangsamt. Nach 30 Minuten an den meisten Stellen langsame Bewegung. Nach 45 Minuten fast überall Stillstand, nur an vereinzelten Stellen noch langsame Bewegung.

b) 0,65 % NaCl: Zu Anfang überall schöne stromerzeugende Bewegung. Nach 15 Minuten zum Teil Stillstand, an vielen Stellen stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten meistens Stillstand. Nach 45 Minuten überall Ruhe.

c) 0,59 % NH_4Cl: Zunächst an den meisten Stellen außerordentlich rasche Bewegung. Nach 30 Minuten ist ganz allmählich Stillstand eingetreten.

In diesem Versuche war der Unterschied in der Qualität des Schlages, je nachdem NaCl oder KCl einwirkt, von Anfang an evident; bei NaCl fanden wir zunächst sehr rasche, eine normale Strömung erzeugende Bewegung, bei KCl war zu gleicher Zeit die Bewegung im allgemeinen langsamer; bei NaCl hörte dann die rasche Bewegung an den einzelnen Stellen plötzlich auf, bei KCl verlangsamte sie sich überall allmählich. NH_4Cl steht dem KCl im Typus seines Einflusses viel näher als NaCl. Der Einfluß auf die Schlagdauer allein wäre durch die Reihe $NH_4Cl > NaCl > KCl$ auszudrücken.

13. 0,59% Ammoniumchlorid, 1,87% Caesiumchlorid und 0,47% Lithiumchlorid (17. X. 1908).

a) 0,59% NH_4Cl: An den meisten Stellen außerordentlich rasche, an mehreren verlangsamte Bewegung, hier und da Stillstand. Nach 15 Minuten ist da und dort die Bewegung langsamer geworden, meist ist sie aber noch rasch. Nach 30 Minuten meist Stillstand, aber an mehreren Stellen noch mäßig geschwinde Bewegung. Epithel gut konserviert.

b) 1,87% CsCl: Anfangs meist lebhafte Bewegung, hier und da Stillstand. Nach 15 Minuten in der Hälfte Stillstand, in der anderen Hälfte mäßig schnelle Bewegung. Nach 30 Minuten Stillstand. Epithel gut konserviert.

c) 0,47% LiCl: Gleich an den meisten Stellen Stillstand, aber vereinzelt auch rasche Bewegung. Nach 5 Minuten hat die rasche Bewegung brüsk aufgehört.

Während also auf die Dauer des Schlages die Lösung von CsCl schädlicher wirkt als die Lösung von NH_4Cl (gewöhnlich ist der Unterschied in dieser Beziehung noch stärker als gerade in diesem Versuche), stehen die beiden sich, wenn man von der anfänglichen Reizwirkung des Ammonsalzes absieht, in der Art, wie sie auf die Qualität des Schlages einwirken, recht nahe, da das eine wie das andere so wirkt, daß die Bewegung in ihren Lösungen allmählich abstirbt.

14. 0,83% Kaliumchlorid, 0,65% Natriumchlorid und 1,34% Rubidiumchlorid (19. X. 1908).

a) 0,83% KCl: Anfangs an den meisten Stellen rasche Bewegung an einigen Stillstand. Nach 30 Minuten an vielen Stillstand, an vielen ziemlich schnelle Bewegung. Nach 45 Minuten fast überall Ruhe, hier und da ganz langsame Bewegung.

b) 0,65% NaCl: Fast überall zu Anfang stromerzeugende Bewegung, nur an vereinzelten Stellen Stillstand. Nach 30 Minuten ist an vielen Stellen der Stillstand rapid eingetreten, an mehreren besteht aber noch schönste stromerzeugende Bewegung. Nach 1 Stunde überall Ruhe.

c) 1,34 % RbCl: Gleich an vielen Stellen Stillstand, an den übrigen langsame Bewegung. Nach 30 Minuten an mehreren Stellen noch ganz langsame Bewegung. Nach 45 Minuten überall Stillstand.

Es besteht also ein deutlicher Unterschied zwischen den drei Salzen: in RbCl-Lösung ist der Schlag von Anfang an relativ langsam und wird bis zum Stillstand allmählich immer langsamer; in der KCl-Lösung ist er zuerst lebhaft und wird dann nach und nach immer langsamer; in NaCl-Lösung ist der Schlag anfangs sehr lebhaft, um dann von Stelle zu Stelle prompt zu erlöschen. —

Überblicken wir die Ergebnisse der hier angeführten sowie aller sonst noch angestellten Versuche mit den isotonischen Chloridlösungen, so ist es offenbar nicht möglich, kurz zu sagen, wie sich die einzelnen Salze in ihrer Wirkung auf das Flimmerepithel gegenseitig abstufen. Würden wir bloß danach urteilen, wie lange der Schlag in den einzelnen Lösungen andauert, dann würden wir freilich durch die einfache Formel

$$LiCl > CsCl > NH_4Cl > NaCl, RbCl > KCl$$

so ziemlich alles ausgedrückt haben; eine Formel, welche auch zur Darstellung unserer Ergebnisse mit den hypertonischen Lösungen genügte. Wenn wir aber beachten, wie auf einen großen Teil des Epithels das NaCl rasch deletär wirkt, während ihm andere Teile länger widerstehen, um erst nach und nach plötzlich zu erliegen, so wird man zweifelhaft, wie man das ausdrücken soll. Könnte man einwandsfrei die Gesamtenergie des Flimmerns messen, so ließe sich eher in kurzer Form ein Bild von der verschiedenen Wirkung der Salze geben, wenn man die Abnahme der Minutenenergie mit der Zeit für jedes Salz durch eine Kurve darstellte. Man würde dann ohne Zweifel finden, daß dieser Effekt in der NaCl-Lösung viel rascher abnimmt als in KCl- oder RbCl-, ja nach unserem Eindruck auch rascher als in NH_4Cl-Lösung, daß allerdings ein kleiner Rest von Leistung noch relativ lange übrig bleibt.

D. Der Einfluß der Alkalisulfate in isotonischer Lösung. Zur Kontrolle der mitgeteilten Ergebnisse über die Wirkung der Chloride haben wir noch eine zweite Versuchsreihe mit Sulfaten ausgeführt. Wir können als Resultat gleich vorwegnehmen, daß die Alkalien in Gegenwart der SO_4-Ionen

verhältnismäßig ebenso wirken wie in Gegenwart der Cl-Ionen. Die einzige Besonderheit, die uns auffiel, wäre die, daß der Unterschied zwischen Na_2SO_4 und K_2SO_4 in ihrer Wirkung auf die Schlagdauer deutlicher ist als der zwischen NaCl und KCl. Auch hier geben wir ein paar Protokolle als Beispiele.

15. 3,08% Caesiumsulfat, 1,21% Natriumsulfat und 1,48% Kaliumsulfat (20. X. 1908).

a) 3,08% Cs_2SO_4: Zu Beginn an den meisten Stellen langsame Bewegung, an mehreren Stillstand. Nach 30 Minuten an einigen Stellen langsame Bewegung, im übrigen Stillstand. Nach 45 Minuten überall Ruhe.

b) 1,21% Na_2SO_4: An den meisten Stellen zunächst stromerzeugende Bewegung, nur hier und da Stillstand. Nach 30 Minuten meistens Stillstand, an mehreren Stellen aber noch rasche Bewegung. Nach 60 Minuten überall Stillstand.

c) 1,48% K_2SO_4: Meistens zuerst rasche Bewegung, hier und da Stillstand. Nach 30 Minuten meist noch rasche Bewegung. Nach 45 Minuten Bewegung langsamer. Nach 60 Minuten an den meisten Stellen langsame, an mehreren aber noch rasche Bewegung. Nach 1 Stunde 30 Minuten fast überall Stillstand, nur an einzelnen Stellen noch ziemlich schnelle Bewegung.

16. 1,21% Natriumsulfat, 2,25% Rubidiumsulfat und 1,48% Kaliumsulfat (21. X. 1908).

a) 1,21% Na_2SO_4: Anfangs an mehreren Stellen sehr rasche Bewegung, sonst Stillstand. Nach 20 Minuten nur noch an einzelnen Stellen rasche Bewegung. Nach 60 Minuten an zwei Stellen noch rasche Bewegung, sonst Ruhe.

b) 2,25% Rb_2SO_4: Zunächst an mehreren Stellen langsame Bewegung, sonst Ruhe. Nach 30 Minuten an einzelnen Stellen noch langsame Bewegung. Nach 45 Minuten an zwei Stellen ganz langsame Bewegung. Nach 60 Minuten überall Stillstand.

c) 1,48% K_2SO_4: Anfangs fast überall sehr schöne Bewegung. Nach 30 Minuten an den meisten Stellen noch dieselbe Bewegung. Ebenso nach 60 Minuten.

17. 1,21% Natriumsulfat, 1,48% Kaliumsulfat und 1,12% Ammoniumsulfat (22. X. 1908).

a) 1,21% Na_2SO_4: Zu Beginn überall schönste stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten ist an den meisten Stellen brüsk Stillstand eingetreten. Nach 45 Minuten an drei Stellen noch rasche Bewegung. Nach 50 Minuten überall Ruhe.

b) 1,48% K_2SO_4: Zu Beginn überall sehr rasche Bewegung. Nach 15 Minuten meistenteils rasche, an mehreren Stellen deutlich verlang-

samte Bewegung. Nach 30 Minuten in der Hälfte verlangsamter Schlag. Nach 50 Minuten an mehreren Stellen noch langsame Bewegung, sonst Stillstand.

c) 1,12 % $(NH_4)_2SO_4$: An mehreren Stellen gleich Stillstand, an anderen langsame Bewegung. Nach 30 Minuten an mehreren Stellen langsame Bewegung. Nach 45 Minuten überall Stillstand.

E. Zusammenfassung der mit den isotonischen Lösungen gewonnenen Ergebnisse. Von den beiden Versuchsreihen, welche wir zur Entscheidung über den Einfluß der Alkali-Kationen auf den Flimmerschlag ausgeführt haben, von der Reihe mit hypertonischen und derjenigen mit isotonischen Lösungen, ist die letztere zweifellos die wertvollere. Denn erst bei der Verwendung der schwächeren Lösungen wurde es möglich, den Salzeinfluß nicht bloß nach der Dauerhaftigkeit der Cilienbewegung zu beurteilen, sondern auch feinere Unterschiede, wie eine anfängliche Reizwirkung und vor allem Differenzen in der Art des Erlöschens der Bewegung, zu bemerken. Der Einfluß eines jeden Alkali-Kations läßt sich nach unserer Meinung besonders charakterisieren.

Die Lithiumsalze lassen die Flimmerbewegung nur kurze Zeit persistieren; dann erlischt unmittelbar nach voller Lebhaftigkeit der Schlag ganz plötzlich. Die Cilien bewahren danach ihr normales Aussehen und stehen gewöhnlich senkrecht zur Zelloberfläche.

Bei den Ammoniumsalzen haben wir dieselbe Lage der Cilien senkrecht zur Oberfläche nach dem Absterben der Bewegung gefunden. Für die letztere ist hier charakteristisch, daß sie im Anfang der Salzwirkung einen gesteigerten Eindruck macht; die Bewegung erscheint dann bedeutend rascher, als selbst beim Einfluß von Natriumsalzen, welche im übrigen von allen Alkalisalzen den lebhaftesten Flimmerschlag erzeugen. Aber während durch die Natriumsalze eine zwar sehr rasche, aber doch auffallend regelmäßige Wellenbewegung hervorgerufen wird, welche treffend mit dem Aussehen einer in leichtem Winde wogenden Wiese verglichen worden ist, macht die Bewegung im Anfang der Ammonsalzwirkung einen aufgeregten und flackernden Eindruck. Allmählich stellt sich dann eine ruhigere Tätigkeit ein, indem jede Cilie mit immer kleiner werdender Amplitude schlägt.

Bei den Salzen des Caesiums begegnet man von Anfang an den allermannigfaltigsten Abstufungen in der Bewegung, von der ganz raschen Aktion angefangen bis zu der ganz langsamen, aussterbenden, und man kann gut beobachten, wie an den verschiedensten Stellen die Bewegung ganz aufhört, bis man schließlich nur hier und da noch etwas Bewegtes aufblitzen sieht. Zum Schluß ihres Flimmerns legen sich die Cilien, obwohl sie gut erhalten sind, wie geknickt nieder, wie vom Regen zerschlagenes hohes Gras.

Bei den Salzen des Kaliums nimmt zwar während des Versuches die Cilienbewegung mehr und mehr ab; aber zu Anfang ist sie, im Gegensatz zur Caesiumwirkung, sehr rasch. Eine für diese Salze charakteristische Ruhelage der Cilien haben wir nicht gefunden.

Die Salze des Natriums bewirken, wie nun schon oft erwähnt wurde, von Anfang an eine schnelle, regelmäßig wellenförmige Tätigkeit, welche plötzlich erlischt, an verschiedenen Stellen zu verschiedenen Zeiten, in der Natriumsulfatlösung noch augenfälliger als in den Natriumchloridlösungen, und meist hat schon in den ersten 30 Minuten auf mehr als der Hälfte des Präparatrandes der Schlag aufgehört, wenn er wo anders gleichzeitig noch seine anfängliche Lebhaftigkeit hat.

Die Salze des Rubidiums endlich stehen nach der Qualität des Flimmerschlages den Kalisalzen am nächsten, sie wirken nur rascher ungünstig als diese. —

Schließlich wollen wir nun noch diese Ergebnisse kurz zusammenzufassen suchen: Für den Einfluß der von Cl- oder SO_4-Ionen begleiteten Alkaliionen auf die Dauer des Flimmerschlags gilt die Reihenfolge:

$$Li > Cs > NH_4 > Na, \ Rb > K.$$

Charakteristischere Unterschiede in den Ioneneinflüssen werden aber zum Ausdruck gebracht, wenn man, ähnlich wie das schon auf S. 528 geschah, in ideeller Kurve die Abnahmen der vom Flimmerepithel gelieferten Minutenenergie in der Zeit darstellt: man wird dann etwa zu folgendem Bilde kommen:

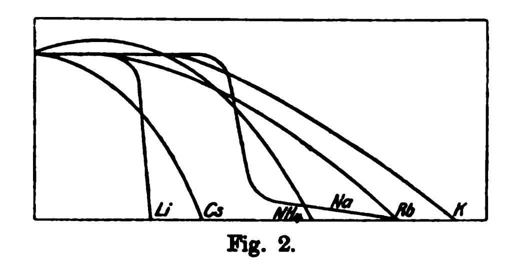


Fig. 2.

Dieses Bild entspricht viel mehr einer Reihe:

Li > Cs > Na > NH_4 > Rb > K.

F. Die Wirkung einiger anorganischer Anionen in isotonischer Lösung. Von Anionen untersuchten wir bisher Cl, Br, J, SO_4 und NO_3 in Begleitung von Na oder K. Zur Veranschaulichung ihrer Wirkung teilen wir wieder einige unserer Protokolle mit.

18. **1,67 % Natriumjodid, 1,21 % Natriumsulfat und 0,65 % Natriumchlorid (9. X. 1908).**

a) 1,67 % NaJ: Von Anfang an an den meisten Stellen Stillstand, hier und da langsame Bewegung. Nach 30 Minuten Ruhe.

b) 1,21 % Na_2SO_4: Zu Beginn an den meisten Stellen ausgezeichnete strömungerzeugende Bewegung, an einzelnen Stillstand. Nach 30 Minuten an den meisten Stellen Stillstand, an zwei Stellen rasche Bewegung. Nach 60 Minuten dasselbe.

c) 0,65 % NaCl: Zu Beginn an den meisten Stellen schöne stromerzeugende Bewegung, an mehreren Stillstand. Nach 30 Minuten meistens Stillstand, an einem Rande noch lebhafte Bewegung. Nach 60 Minuten noch an zwei Stellen lebhafte Bewegung, im übrigen Ruhe.

Resultat: NaJ > Na_2SO_4. NaCl.

19. **1,67 % Natriumjodid, 1,15 % Natriumbromid, 1,21 % Natriumsulfat und 0,65 % Natriumchlorid (13. X. 1908).**

a) 1.67 % NaJ: Anfangs an den meisten Stellen sehr rasche, unkoordinierte, hüpfende Bewegung. Nach 30 Minuten meistens Stillstand, an mehreren Stellen absterbende Bewegung. Nach 40 Minuten überall Ruhe.

b) 1,15 % NaBr: Zuerst fast überall unkoordinierte, rasche Bewegung. Nach 30 Minuten noch rasche, aber doch schon verlangsamte Bewegung; an mehreren Stellen Stillstand. Nach 40 Minuten fast überall Stillstand, hier und da ganz langsames Erlöschen.

c) 1,21 % Na_2SO_4: Zuerst meistens rasche, stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten noch an mehreren Stellen dieselbe Bewegung, sonst Stillstand. Nach 60 Minuten überall Stillstand.

d) 0,65 % NaCl: Anfangs an den meisten Stellen sehr schöne stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten zum Teil Strombewegung, zum Teil Stillstand. Nach 60 Minuten noch fast an der Hälfte des Präparates Strombewegung, sonst Stillstand.

Resultat: NaJ > NaBr > Na_2SO_4 > NaCl.

20. 1,67 % Natriumjodid, 0,94 % Natriumnitrat und 0,65 % Natriumchlorid (14. X. 1908).

a) 1,67 % NaJ: Fast überall Stillstand, da und dort rasche tanzende Bewegung. Nach 30 Minuten überall Ruhe. Epithel gut konserviert.

b) 0,94 % $NaNO_3$: Anfangs fast überall lebhafte Bewegung, hier und da Stillstand. Nach 30 Minuten an den meisten Stellen Stillstand, an mehreren rasche Bewegung. Nach 60 Minuten überall Stillstand.

c) 0,65 % NaCl: Anfangs meistenteils schöne stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten fast überall Stillstand, hier und da noch die rasche Bewegung. Nach 60 Minuten überall Ruhe.

Resultat: NaJ > $NaNO_3$, NaCl.

21. 1,84 % Kaliumjodid, 1,48 % Kaliumsulfat und 0,83 % Kaliumchlorid (12. X. 1908).

a) 1,84 % KJ: Gleich an den meisten Stellen Stillstand, nur hier und da lebhafter Schlag. Nach 30 Minuten überall Ruhe. Epithelschicht ziemlich stark gelockert.

b) 1,48 % K_2SO_4: Überall zu Anfang schöne stromerzeugende Bewegung, die noch nach 1 Stunde unverändert besteht. Nach 1 Stunde 30 Minuten an den meisten Stellen noch die Strombewegung.

c) 0,83 % KCl: Anfangs überall stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten an mehreren Stellen Stillstand, sonst rasche Bewegung. Nach 1 Stunde vielfach Stillstand. Nach 1 Stunde 30 Minuten entweder Stillstand oder verlangsamte Bewegung.

Resultat: KJ > KCl > K_2SO_4.

22. 1,84 % Kaliumjodid, 1,33 % Kaliumbromid und 1,48 % Kaliumsulfat (12. X. 1908).

a) 1,84 % KJ: Gleich totaler Stillstand. Epithelschicht an mehreren Stellen zerstört.

b) 1,33 % KBr: Zuerst an den meisten Stellen Stillstand, an mehreren absterbende Bewegung. Nach 30 Minuten Ruhe. Epithel gut konserviert.

c) 1,48 % K_2SO_4: Anfangs überall stromerzeugende Bewegung. Nach 30 Minuten dasselbe. Nach 1 Stunde 30 Minuten an den meisten Stellen noch geschwinde Bewegung.

Resultat: KJ > KBr > K_2SO_4.

23. 1,84 % Kaliumjodid, 1,12 % Kaliumnitrat und 0,83 % Kaliumchlorid (14. X. 1908).

a) 1,84 % KJ: An den meisten Stellen gleich Stillstand, hier und da ziemlich rasche Bewegung. Nach 30 Minuten überall Ruhe. Epithel stark gelockert.

b) 1,12 % KNO_3: Anfangs an den meisten Stellen stromerzeugende Bewegung, hier und da Stillstand. Nach 30 Minuten meist langsame Bewegung, aber zum Teil auch rasche Bewegung, zum Teil Stillstand. Nach 60 Minuten noch hier und da lebhafte Bewegung, sonst Ruhe.

c) 0,83 % KCl: Zunächst an den meisten Stellen lebhafte Bewegung, an mehreren Stillstand. Nach 30 Minuten meist Stillstand oder langsame Bewegung, an einigen Stellen Bewegung lebhafter. Nach 70 Minuten überall Ruhe.

Resultat: $KJ > KNO_3 > KCl$.

Aus diesen und anderen ähnlichen Versuchen sind wir zu folgenden Erfahrungen gelangt: Was den Einfluß der eben besprochenen Salze auf die Qualität des Flimmerschlags anlangt, so hat sich, wie früher, so auch jetzt wieder ergeben, daß die Kaliumionen allmählich, die Natriumionen brüsk die Flimmerbewegung sistieren, wenn von Anionen SO_4, Cl oder NO_3 die Alkaliionen begleiten. Dagegen erlischt in Gegenwart von Br- oder J-Ionen die Bewegung in beiden Fällen allmählich. Br- und J-Ionen zeichnen sich auch insofern aus, als sie, besonders zusammen mit den Na-Ionen, die normale Wellenbewegung der Flimmerhaare beseitigen und an deren Stelle eine unkoordinierte, unstete, hüpfende Bewegungsform setzen. Jodkali zerstört den festen Verband der einzelnen Zellen miteinander.

Was den Einfluß auf die Dauer des Flimmerschlags anlangt, so fanden wir, daß Jodide und Bromide ungefähr gleich stark wirken, daß, verbunden mit K, Cl im allgemeinen etwas ungünstiger ist als SO_4, während in Gegenwart von Na das Verhältnis eher das umgekehrte ist, wenn nicht dann Cl und SO_4 gleich wirken.

Im ganzen können wir die gefundenen Anionenwirkungen ausreichend zur Anschauung bringen, wenn wir sie einfach nach ihrem Einfluß auf die Dauer des Schlags in eine Reihe ordnen. Diese Anionenreihe lautet:

$$J,\ Br > NO_3 > Cl,\ SO_4.$$

Blicken wir nun, mit den gesammelten Erfahrungen versehen, zu den eingangs besprochenen Angaben anderer Autoren über den Einfluß reiner Alkalisalzlösungen auf den Flimmerschlag zurück! Die Reihen, die wir jetzt mit den unserigen zu vergleichen haben, sind:

J > Br > Cl (**Weinland**),
J > Br, NO_3, SO_4 > Cl (**Lillie**), und
Cs > Rb > K (**Weinland**),
Na > K > NH_4 (**Weinland**),
NH_4, K > Li ≫ Na (**Maxwell**),
Li > Na > Cs, NH_4 > Rb > K (**Lillie**).

Beginnen wir den Vergleich mit den Anionen! Da wir die Anionenreihe: J. Br > NO_3 > Cl, SO_4 gefunden haben, so können wir feststellen, daß eine erhebliche Meinungsverschiedenheit zwischen uns und den älteren Autoren nicht besteht.

Anders ist es mit unseren Erfahrungen über die Wirkung der Kationen! Diese haben uns zu der Ansicht geführt, daß ihr Einfluß auf das Flimmerepithel am besten durch die die Qualität der Schlagverminderung mit berücksichtigende Reihe:

Li > Cs > Na > NH_4 > Rb > K

auszudrücken ist (s. S. 531 und 535).

Vergleichen wir damit zuerst die Angaben von **Weinland**. Ersichtlich haben auch wir dessen Reihe: Cs > Rb > K gefunden. Dagegen kommt seine Reihe: Na > K > NH_4 in unseren Ergebnissen nicht vor, und wir müssen uns fragen, wie **Weinland** diese Reihe gefunden hat. Aus seinen Protokollen und sonstigen Angaben ist nur zu entnehmen, daß er durch direkten Vergleich die Stellung Na > K und die Stellung Na > NH_4 ermittelt hat. Mit beiden sind wir einverstanden. Dagegen hat er es offenbar unterlassen, zu prüfen, ob die Aufstellung K > NH_4, welche er nach dem bloßen Vergleich verschiedener Versuche miteinander für wahrscheinlich hält, auch den wirklichen Sachverhalt ausdrückt. Hier ist ihm offenbar ein Irrtum passiert. Und dasselbe gilt sicherlich für seine Gesamtreihe, welche S. 520 angegeben wurde und welche lautet: Cs > Rb > Na > K > NH_4. Auch diese Reihe ist nur unter der Benutzung der Ergebnisse verschiedener Versuche zusammengestellt und nicht experimentell entstanden. So finden wir also schließlich, daß unsere Resultate mit keinem tatsächlichen Befund von **Weinland** in Widerspruch geraten, und daß eine gegenseitige Disharmonie nur da vorkommt, wo **Weinland** sich auf Vermutungen einläßt. Über die Wirkung von Lithiumsalzen hat **Weinland** keine Angaben gemacht.

Eine auch in diesem Punkte vollständige Kationenreihe fanden wir bei Lillie, und es fällt nun gleich auf, daß dessen Reihe fast mit der unsrigen identisch ist. Allein die Schädlichkeit der Natriumsalze ist in seinen Versuchen ausgesprochener hervorgetreten als bei uns. Es ist für diesen Punkt vielleicht nicht gleichgültig, daß sein Versuchsobjekt aus dem Meerwasser stammte.

Ziehen wir endlich noch die Reihe von Maxwell zum Vergleich heran, so können wir nur ihre völlige Verschiedenheit von der unsrigen konstatieren. Einen Grund vermögen wir nicht dafür anzugeben.

Es bleibt also als Fazit dieses Rückblicks, daß nach dem übereinstimmenden Ergebnis dreier Untersuchungen die Alkali-Kationen etwa in der Reihenfolge:

$$Li > Cs, Na > NH_4 > Rb > K$$

den Schlag des Flimmerepithels beeinflussen.

Ziehen wir nun noch speziell unsere eigenen Ergebnisse über die Kationenwirkung weiter in Betracht, am einfachsten so, wie sie in der Kurvenschar auf S. 535 wiedergegeben sind, so zeigt sich, daß zwei Typen der Einwirkung auf den Flimmerschlag zu unterscheiden sind, der eine wird durch Li und Na, der andere durch Cs, NH_4, Rb und K repräsentiert. Der eine Typ ist durch die anfängliche Erhaltung und dann folgende rapide Sistierung des Schlagens gekennzeichnet, der andere durch allmähliche, kontinuierlich zunehmende Schädigung. Wir finden also die Alkalien hier auf dieselben zwei Gruppen verteilt, welche sie bekanntlich auf Grund mancher ihrer chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften (z. B. Löslichkeit ihrer Salze, Wanderungsgeschwindigkeit) bilden.

Auf der andern Seite haben wir aber auch gefunden, daß, wie gleichfalls aus der Fig. 2 zu ersehen ist, beim Vergleich der Intensitäten der Schädigung, die durch die einzelnen Kationen bewirkt werden, diese Verteilung der Kationen auf zwei gesonderte Gruppen keineswegs hervortritt. Vielmehr sind da die beiden Gruppen offenbar in folgender Art ineinandergeschoben:

Li   Na
        Cs NH_4 Rb   K.

Etwas ähnliches habe ich schon einmal gefunden, nämlich beim Einfluß der Alkalisalze auf die Eigenschaften der Muskeln.[1]) In diesem Falle wirken die Kationen nach der Reihenfolge: Li, Na, Cs, NH_4, Rb, K, also fast in der gleichen Abstufung, in der sie auf das Flimmerepithel wirken. Aber während nun beim Einfluß auf die Erregbarkeit der Muskeln das Cs in der Schädlichkeit seiner Wirkung sich viel mehr dem NH_4, Rb und K anschließt als dem Li und Na, so daß die Verteilung der Alkalien auf ihre zwei Gruppen recht deutlich zum Ausdruck kommt, verhält sich beim Einfluß auf den Ruhestrom das Cs mehr wie Li und Na, und weniger wie NH_4, Rb und K; wir haben alsdann wieder eine Übereinanderschiebung der Reihen in folgender Art:

Li	Na			
	Cs	NH_4	Rb	K.

Zum Schluß sei nun noch hervorgehoben, daß die für das Flimmerepithel gefundene Reihe der Kationen, ebenso wie die Reihe der Anionen identisch sind mit Reihen, welche bei anderen physiologischen Vorgängen gefunden worden sind. Solche sind die Änderungen in der Erregbarkeit der Muskeln und die Änderungen ihres Ruhestroms durch Salze — beide sind ja eben schon genannt worden —, es sind ferner die von mir untersuchten, durch die Salze bedingten hämolytischen Vorgänge.[2]) Es sind nun also schon vier physiologische Prozesse bekannt, welche von den Salzen nach den gleichen Regeln beherrscht werden. Das einzige bekannte physikalisch-chemische Analogon hierzu ist der Einfluß der Salze auf die Fällung der Kolloide Eiweiß und Lecithin.[3]) Deshalb liegt auch hier wiederum der Schluß nahe, die Salzwirkung auf das Flimmerepithel als Wirkung auf die Protoplasmakolloide aufzufassen. Dieser Schluß kann dann vielleicht noch durch folgende Bemerkung bekräftigt werden: Wir fanden, daß die Aktionsfähigkeit der Flimmerepithelien in der Reihenfolge:

$$Li > Cs > Na > NH_4 > Rb > K$$

[1]) Pflügers Archiv 106, 599, 1905 und 126, 331, 1909, besonders S. 346 und 347.

[2]) Diese Zeitschr. 14, 209, 1908.

[3]) Höber, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 35, 1907.

geschädigt wird; die Aktionsfähigkeit der Muskeln wird durch die Alkalien gerade in umgekehrter Richtung der Reihe:

$$Li < Na < Cs < NH_4 < Rb < K$$

geschädigt. Entsprechendes gilt für die Anionen. Die gegenseitige Abstufung der Ionen ist also bei beiden physiologischen Vorgängen dieselbe, aber die Richtung der Wirksamkeitsänderung hat verkehrtes Vorzeichen. Wenn wir nun auf der Annahme fußen, daß die Salzwirkung eine Wirkung auf die Kolloide ist, und wenn wir als wahrscheinlich voraussetzen, daß beide Male eine absteigende Änderung in der Erregbarkeit das Gleiche im Kolloidalen bedeutet, nämlich entweder Auflockerung oder Verdichtung, so finden die physiologischen Tatsachen gerade darin ihren besten Anschluß an die Erscheinungen bei den Kolloiden, daß manche von diesen, je nach dem Vorzeichen ihrer elektrischen Ladung, von Ionen gerade so beeinflußt werden wie die organischen Gebilde, d. h., daß die Ionen zwar in gleicher gegenseitiger Abstufung, aber mit verschiedener Richtung der Wirksamkeitssteigerung in der Reihe auf die Kolloide fällend wirken.

So schließt sich also eine ganze Anzahl von Salzeinflüssen physikalisch-chemischer und physiologischer Natur in natürlicher Weise zu einem Gebiet zusammen. Es scheint mir darum, daß, wenn neuerdings manche Autoren glauben, mit besonderem Nachdruck darauf hinweisen zu müssen, daß manchmal die gleichen Ionen auf verschiedene physiologische Objekte verschieden wirken, um daraus zu schließen, daß wir von der Möglichkeit, in der Physiologie der Salze Gesetze aufzustellen, noch weit entfernt seien, und vor Verallgemeinerungen zu warnen, der entgegengesetzte Standpunkt geradeso berechtigt ist, welcher in den bisher aufgefundenen Übereinstimmungen bei einander äußerlich sehr fern stehenden Phänomenen eine Aufmunterung zu synthetischem Vorgehen in der Physiologie der Salze erblickt.

Zusammenfassung.

1. In den Lösungen neutraler Alkalisalze erlischt die Flimmerbewegung an der Rachenschleimhaut vom Frosch je nach dem wirkenden Salz in verschiedener Weise; die Art der Verschiedenheiten ist so beschaffen, daß eine unabhängige Wirkung von Kation und Anion daraus abgeleitet werden kann.

2. Die Anionen wirken in abnehmendem Maße schädigend in der Reihenfolge: J, Br, NO_3, Cl, SO_4, so daß der Flimmerschlag am raschesten in Jodid- und Bromidlösungen, am langsamsten in Chlorid- und Sulfatlösungen erlischt.

3. Die Kationenwirkung äußert sich komplizierter. Li und Na halten den Flimmerschlag eine Zeitlang auf normaler Höhe, um ihn dann ziemlich akut stark zu vermindern; Li ist dabei das stärkere Gift. Dagegen wirken Cs, NH_4, Rb, K kontinuierlich verschlechternd auf die Bewegung, K am langsamsten, Cs am raschesten.

4. Aus diesen verschiedenen Formen der Kationenwirkung resultiert für die Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit des Flimmerepithels eine Reihenfolge der Kationen, welche, mit dem stärkst wirkenden Ion angefangen, lautet: Li, Cs, Na, NH_4, Rb, K.

5. Diese Befunde stimmen erstens mit den Angaben von Weinland überein, welcher die Reihenfolgen: J, Br, Cl — Cs, Rb, K — Na, NH_4 und Na, K aufstellte, und zweitens mit den Angaben von Lillie, welcher die Reihen J, Br, NO_3, SO_4, Cl und Li, Na, Cs, NH_4, Rb, K angab. Abweichend sind nur Angaben von S. S. Maxwell.

6. Die Kationen- und die Anionenreihe haben ihr Analogon in den Reihenfolgen, in denen die Ionen ihre Wirkung auf mehrere Eigenschaften von Muskeln und auf Blutkörperchen äußern.

7. Die Kationen- und Anionenreihe haben ferner ihr Analogon in den Reihenfolgen, in welchen die Ionen ihr Fällungsvermögen gegenüber gewissen Kolloiden betätigen.

8. Das Ion, das in der Kationen- und in der Anionenreihe auf den Flimmerschlag am ungünstigsten wirkt, wirkt auf die Muskelerregbarkeit am günstigsten, und umgekehrt wirkt das für den Flimmerschlag günstigste Ion auf die Muskelerregbarkeit am ungünstigsten. Derartige Umkehrungen der Ionenreihen erinnern gleichfalls an entsprechende Vorkommnisse bei Kolloidvorgängen.

Über Lipoproteide und die Deutung der degenerativen Zellverfettung.[1])

II. Lipopeptide, ihre Bedeutung, Synthese und Eigenschaften. (Laurylglycin und Laurylalanin).

Von

S. Bondi.

(Aus der ersten medizin. Klinik in Wien und dem medizin. chemischen Laboratorium der Wiener allgemeinen Poliklinik.)

(Eingegangen am 26. März 1909.)

In der folgenden Arbeit wird die Synthese von Verbindungen besprochen, welche aus Fettsäuren und Aminosäuren bestehen. In der ersten Mitteilung konnten die Gründe, welche den Anlaß zu diesen Synthesen boten, nur gestreift werden. — Sie seien daher hier nochmals behandelt.

G. Rosenfeld[2]) hat die Tatsache festgestellt, daß in die Leber von Tieren, welche mit Phosphor vergiftet waren, eine Fetteinwanderung stattfindet. Damit schien die frühere Ansicht widerlegt, nach welcher es sich bei der Phosphorleber um eine Umwandlung von Zelleiweiß in Fettsubstanz handeln sollte. Letztere Anschauung erhielt jedoch eine Stütze, als mehrere Autoren darauf hinwiesen, daß sich in den Zellen von autolysierenden Lebern reichlich Fetttröpfchen bilden. Für diese Fettsubstanzen war natürlich eine Einwanderung ausgeschlossen, und als Quelle blieb nur das ursprüngliche Zelleiweiß übrig, so lange wenigstens, als in dieser Frage nur histologische Methoden zur Anwendung kamen. Die Zellverfettung bei der Autolyse erfuhr jedoch eine weitgehende Umdeutung infolge der Resultate,

---

[1]) S. Bondi unter gleichem Titel. Wiener klin. Wochenschr. 1908, Nr. 14.

[2]) G. Rosenfeld, siehe besonders Ergebnisse der Physiologie 1 u. 2.

welche mit chemischen Methoden gewonnen wurden. Mehrere Autoren, zuletzt und endgültig P. Saxl[1]), fanden den absoluten Fettgehalt von Organen vor und nach der Autolyse gleich groß und folgern daraus, daß die Autolyse nur ein vorher verborgenes Fett sichtbar mache und es dem histologischen Nachweis zuführe, während es bei eingreifenden, chemischen Methoden auch vor der Autolyse erkennbar ist.

Die vorgebrachten Tatsachen führen ohne jeden Zwang zu dem Schluß, daß in den Zellen der Organe Fett mit Eiweiß in irgend einer Bindung sich befinde, und daß die spaltende Wirkung der autolytischen Fermente dieses Fetteiweiß treffe. Es gibt auch auf einem anderen Gebiete Tatsachen, welche die Forscher zu der Annahme von Fetteiweißverbindungen drängen. Wie J. Liebermann, J. Nerking u. a. Autoren, zuletzt Kumagawa-Suto[2]) zeigten, ist eine einfache Ätherextraktion niemals imstande, den Fettgehalt, selbst feingepulverter und getrockneter Organe, quantitativ anzugeben. — Es sind immer hierzu Methoden nötig, welche eine weitgehende, chemische Aufspaltung von Eiweiß besorgen. So nimmt Liebermann siedende Lauge, Nerking die Pepsinverdauung zu Hilfe. Diese Tatsache veranlaßte die Autoren zu der Folgerung, daß ein Teil der Fettsubstanzen der Organgewebe mit dem Eiweiß derselben chemisch verbunden sei.

In letzter Zeit haben in der Biologie, speziell in der Immunitätslehre, mannigfache Tatsachen eingehende Würdigung gefunden, welche zeigen, daß viele biologische und namentlich Immunitätsreaktionen der Kombination von Lipoiden mit Eiweißkörpern bedürfen. — Ich möchte hier besonders auf die Arbeiten von Landsteiner und v. Eisler[3]), ferner auf die jünst erschienene Arbeit von E. P. Pick und Oswald Schwarz[4]) hinweisen. Letztere Autoren kommen zu dem Schlusse, daß es sich bei ihren Versuchen „um die Wirkung von Lipoideiweißverbindungen handelt". Wenn es nun auch noch vollkommen in Frage steht, wie weit diese Verbindungen kolloidale Komplexbildungen sind — oder ob es sich um organisch-chemische Ver-

[1]) P. Saxl Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, hier Literatur.
[2]) Kumagawa-Suto, diese Zeitschr. 8 mit der übrigen Literatur.
[3]) Landsteiner und v. Eisler, Wiener klin. Wochenschr. 1904.
[4]) E. P. Pick und O. Schwarz diese Zeitschr. 15.

bindungen handelt, so zeigen auch diese Arbeiten jedenfalls, daß es nötig und von großer Wichtigkeit ist, an die Frage nach der Natur des Fetteiweißes heranzutreten. — Es scheint die Hoffnung nicht zu optimistisch, aus den Resultaten dieser Forschung vielleicht auch die Aufklärung mancher biologischer Probleme zu erzielen.

Wie nun auf dem Gebiete der Eiweißchemie die chemische Synthese von größter Bedeutung war und ist, weil nur sie völlig klare und übersichtliche Versuchsbedingungen zu schaffen vermag und hierdurch weiteren Forschungen eine absolut feste Basis gibt, so schien es denkbar, daß auch auf dem Gebiete des Fetteiweißes die chemische Synthese zu neuen, gesicherten Tatsachen verhelfe.

Daß ich gerade Verbindungen von Fettsäuren mit Aminosäuren wählte, dafür sprachen mancherlei Erwägungen. Es ist bekannt, daß intra corpus häufig Desamidierungen am Eiweißmoleküle vorkommen. Dies dürfte nur an endständigen Aminosäuren geschehen, welche dann durch den Vorgang der Desamidierung zu Fettsäuren werden. Sofern nun die entstandenen Fettsäuren mit dem ursprünglichen Eiweiß im Zusammenhange bleiben, entstehen Komplexe von Aminosäuren, die an freien Amidogruppen amidartig gebundene Fettsäuren tragen. — Es war damit ein direktes Vorbild gegeben für die von mir darzustellenden Körper.

Paarungen mit Aminosäuren sind dem Organismus nichts Fremdes. Wir kennen die gepaarten Gallensäuren und die vielen aromatischen Säuren, welche künstlich eingeführt, nur mit Glykokoll gepaart den Tierkörper verlassen. Es zeigte sich, daß die Seitenketten solcher aromatischer Säuren sich nach einer bestimmten Gesetzmäßigkeit ändern (Gesetz der Oxydation in β-Stellung). Zunächst wurde daraus nur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit gefolgert, daß auch die normalen Fettsäuren nach gleichem Gesetz ihren Abbau erleiden. Diese Meinung wurde fast zur Sicherheit erhoben durch Befunde, welche das Studium der Acetonbildung aus Fettsäuren zutage förderte.

Zeigt daher eine im Harne wieder auftretende, aromatische Säure bezüglich ihrer Seitenkette Änderungen, welche Prägezeichen des intermediären Fettsäurestoffwechsels darstellen, warum sollte ihre Bindung an Glykokoll nicht auch einem Vor-

kommnis beim regulären Fettsäureabbau entsprechen? Ich meine daher, daß sich eine Bindung von Fettsäuren an Eiweißbestandteile aus der erwähnten Glykokollverbindung vermuten läßt. Nur erscheinen diese Körper nicht im Harne, weil sie als normale Stoffwechselprodukte einer endgültigen Verarbeitung zugeführt werden und nicht auf halbem Wege, als unverbrennbar, ausgeschieden werden müssen.

Emil Fischer, E. Abderhalden und ihre Mitarbeiter haben ähnliche Verbindungen dargestellt, indem sie häufig Halogenfettsäuren mit Aminosäuren und Peptiden paarten, um dann durch weitere Behandlung mit Ammoniak höhere Peptide zu erlangen. Ihr Vorgehen diente für die Technik der Synthese zum Vorbild.

Synthese von Laurylglycin.

Laurylchlorid.

Das Säurechlorid der Laurinsäure wurde schon früher mittels Phosphorpentachlorid von Krafft[1]) dargestellt. Die Erfahrungen der letzten Jahre ließen es einfacher erscheinen, die Darstellung mit Thionylchlorid zu wählen. — Da das Säurechlorid nur zur Kuppelung dienen sollte, so war es unnötig, eine Reindarstellung vorzunehmen; wir konnten das unreine Reaktionsprodukt zur weiteren Synthese verwenden. 3,0 g (15 Millimol) Laurinsäure wurden mit ca. 3 ccm Thionylchlorid durch sehr sanftes Anwärmen in Reaktion gebracht, und zwar in einem gewöhnlichen Fraktionierkölbchen. Der Überschuß des Thionylchlorid wurde bei niederer Temperatur im Vakuum verdampft, und das ungefähre Ende des Abdampfens durch Wägung festgestellt. Es hinterblieb eine gelbliche, manchmal mehr bräunliche Flüssigkeit von schwachem Geruche nach Thionylchlorid. Dieses Reaktionsprodukt wurde für die weitere Synthese verwendet.

Darstellung von Laurylglycin.

1,5 g Glykokoll (ein Überschuß) wurden in ca. 20 ccm $^{n}/_{1}$-Natronlauge in Lösung gebracht und abwechselnd das in reinem trockenem Äther gelöste Säurechlorid und ca. 16 ccm $^{n}/_{1}$-Lauge zugesetzt dabei heftig geschüttelt. Bei manchen Versuchen wurde aber viel mehr Lauge gebraucht. Es wurde natürlich immer

[1]) Krafft und Bürger, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 17, 1378.

darauf gesehen, daß die wässerige Flüssigkeit alkalisch blieb, was mehr Lauge erforderlich machte, wenn noch Spuren des Thionylchlorids im Chlorid enthalten waren. Der Prozeß wurde im Laufe einer Stunde vorgenommen. In der Reaktionsflüssigkeit, welche heftig schäumte, blieb ein geringer Niederschlag. Nach mehrstündigem Stehen wurde die Ätherschicht abgetrennt, die wässerige Schicht, mit einer geringen Menge Äther neu durchgeschüttelt, wieder abgetrennt, vom Niederschlag abfiltriert. Das klare Filtrat wurde angesäuert, wobei ein dichter Niederschlag entstand, von dem abfiltriert wurde. Der Niederschlag wurde mit Wasser gewaschen und im Vakuum-Exsiccator über Ätzkali und Schwefelsäure getrocknet; es hinterblieb ein weißes, krystallinisches Pulver von unscharfem Schmelzpunkt: 101°. Erhalten: 2,6 g Rohprodukt. 2,0 g ließen sich leicht aus ca. 160 ccm reinen Benzols umlösen. Es fiel im Laufe einer Stunde eine feinkrystallinische Masse aus. Dieselbe wog nach dem Trocknen 1,4 g und hatte einen Schmelzpunkt von 117,5°.

Nach Abdampfen der Mutterlauge hinterblieb ein geringer, krystallinischer Rückstand, welcher unscharf bei 43° bis 44° schmolz, daher als unreine Laurinsäure zu bezeichnen ist.

Das gewonnene Produkt ist bei Zimmertemperatur gut löslich in Alkohol; schwer löslich bei Zimmertemperatur, leichter beim Erwärmen in Aceton, Chloroform, Essigester, Benzol. — Im Äther beim Erwärmen zeigt es nur geringe Löslichkeit, ganz unlöslich ist das Präparat in siedendem Petroläther.

Das zweimal aus Benzol umkrystallisierte Präparat ergab folgende Analysenwerte:

I. 0,1737 g Substanz ergab 0,4182 g CO_2 und 0,1635 H_2O.

II. 0,2030 g Substanz ergab bei B 740 mm und T. 19° 10,5 ccm N.

In 100 Teilen	I.	II.	Berechnet für $C_{14}H_{27}NO_3$
C	65,63	—	65,37
H	10,55	—	10,59
N	—	5,73	5,47

Laurylglycinnatrium.

Da für biologische Versuche nur das Natriumsalz zu verwenden war, wurde dasselbe in folgender Weise dargestellt:

10,3 g Laurylglycin werden in 100 ccm Alkohol gelöst und mit gleicher Menge Wasser verdünnt, die entsprechende Menge

Soda (13,9 ccm einer $^n/_1$-Lösung) werden in 100 ccm Wasser gegeben und in langsamem Strahl unter Umrühren der erwärmten Lösung der Säure zugemischt. Das Ganze eingedampft. Der pulverisierte Rückstand wird aus ca. 300 ccm gew. Alkohols umgelöst. Beim Abkühlen entstehen wunderschöne lange Nadeln, die sich gut absaugen lassen. Nach dem Trocknen 9,5 g.

Analyse:

I. 0,2076 g gaben 0,0511 g Na_2SO_4.
II. 0,200 g gaben 0,0502 g Na_2SO_4.

In 100 Teilen	I.	II.	Berechnet für $C_{14}H_{26}NO_3Na$
Na	7,96	8,13	8,26

Laurylalanin.

Das nach der beschriebenen Methode dargestellte und in Äther gelöste Laurylchlorid aus 3,0 g Laurinsäure wird unter häufigem Schütteln in eine Lösung von 1,5 g Alanin in 15 cm $^n/_1$-NaOH eingetragen, abwechselnd damit 20 ccm $^n/_1$-Lauge zugefügt. Die wässerige Flüssigkeit wird vom Äther abgetrennt, einmal mit Äther geschüttelt, von diesem getrennt und nun mit HCl angesäuert bis zur deutlich sauren Reaktion von Kongopapier. Vom entstandenen Niederschlag wird abfiltriert und derselbe mit Wasser säurefrei gewaschen. Das getrocknete Reaktionsprodukt hat einen unscharfen Schmelzpunkt von 95° bis 98°. Da es nicht gut aus Benzol allein umkrystallisierbar ist, wird in folgender Weise verfahren:

2,0 g des Rohproduktes werden in 20 ccm Benzol gelöst und die klare Lösung mit gleicher Menge erwärmten Petroläthers versetzt; dabei entsteht eine Trübung, die nach längerem Stehen zu krystallinischer Abscheidung führt (Nadeln). Nach dem Trocknen im Vakuum erhalten 1,5 g; Schmelzpunkt nicht ganz scharf 103° bis 104°.

Analysen:

I. 0,1845 g Laurylalanin geben 0,4490 g CO_2 und 0,1785 H.
II. 0,2542 g Laurylalanin geben bei B. 754 und T. 18° 11,2 ccm N.

In 100 Teilen	I.	II.	Berechnet für $C_{15}H_{29}O_3N$
C	66,35	—	66,37
H	10,75	—	10,70
N	—	5,01	5,17

Das reine Produkt zeigte folgende Löslichkeitsverhältnisse:

Bei Zimmertemperatur ist es löslich in Aceton, Äthyl- und Methylalkohol, etwas weniger löslich in Äthyläther, Benzol, in welchen es aber heiß gut löslich ist, beim Abkühlen fällt nur wenig aus. Ganz unlöslich ist es auch bei Zimmertemperatur in Petroläther.

Laurylalanin-Natrium.

9,0 g Laurylanalin werden in 100 ccm Alkohol gelöst und die entsprechende Menge Soda — ebenfalls in 100 ccm H_2O gelöst — hinzugegeben, eingedampft. Der Rückstand mit Alkohol ausgezogen. Beim Einengen des Alkohols fällt die Substanz aus, welche sich dann wiederum gut aus Alkohol umkrystallisieren läßt (auf 1 g ca. 4 ccm Alkohol). Die reine Substanz krystallisiert in schönen langen, farblosen Prismen.

Nach einigen Richtungen erfordern die Eigenschaften der beschriebenen Verbindungen eine nähere Besprechung, und zwar die Löslichkeitsverhältnisse der freien Säuren, die Färbbarkeit der freien Säure, ferner das Verhalten des Natronsalzes in wässeriger Lösung.

Im Gegensatze zu den reinen Fettsäuren, speziell zur Laurinsäure, sind die beschriebenen Verbindungen in Lipoidlösungsmitteln deutlich weniger löslich, in Petroläther sogar ganz unlöslich. In Äther ist das Laurylglycin weit weniger löslich als etwa die Laurinsäure. Das Laurylalanin ist etwas besser löslich; ganz parallel scheint sich Palmitylglycin und Palmitylalanin zu verhalten. Es ist interessant, daß Verbindungen von Fettsäuren mit Aminosäuren imstande sind, die Löslichkeit der Fettsäure nach der angedeuteten Richtung hin zu ändern.

Beim histologischen Fettnachweis sind zwei Färbungen gebräuchlich: die Färbung mit Überosmiumsäure und mit Scharlach resp. Sudan. Die erste Färbung beruht, wie O. Neubauer und Langstein[1]) nachgewiesen haben, vornehmlich auf der reduzierenden Eigenschaft der doppelten Bindung in der Ölsäure, ist also eigentlich weniger als Fettreaktion zu betrachten, als vielmehr eine Reaktion auf Körper mit doppelter Bindung im engeren Sinne. Die Färbung mit Sudan oder Scharlach ist mehr als

[1]) O. Neubauer und L. Langstein, Kongreß f. innere Medizin.

spezifische Fettreaktion anzusehen. Es läßt sich nun zeigen, daß das Laurylglycin nicht mehr diesen Farbstoff annimmt, während die Laurinsäure sich sehr intensiv färbt.

Versuch.

Gibt man auf einen Objektträger unter Deckgläschen Laurylglycin, auf einem zweiten Objektträger in gleicher Weise Laurinsäure und läßt nun vom Rande her Scharlachlösung unter die Deckgläser einfließen, saugt den Farbstoff nun mit Filtrierpapier nach ca. 10 Minuten ab, indem man gleichzeitig vom anderen Rande stark verdünnten Alkohol zuläßt, bis die Farblösung völlig entfernt ist, so sind die übrigbleibenden Krystalle von Laurylglycin ungefärbt, die Laurinsäurekrystalle scharlachrot.

Eine Prüfung der Eigenschaften einer Lösung von Laurylglycinnatrium im Vergleiche mit einer Lösung der Laurinseife führte ebenfalls zu bemerkenswerten Ergebnissen.

Zur Reindarstellung von laurinsaurem Natron wurde reinste Laurinsäure in der genau entsprechenden Menge verdünnter Sodalösung unter Zufügung von Alkohol in Lösung gebracht und eingedampft. Der Rückstand zweimal aus absolutem Alkohol umgelöst. Bei dem Erstarren während des Abkühlens bildet das Natronsalz der Laurinsäure eine steife Gallerte, die durch Abpressen auf Filtrierpapier vom Alkohol zu befreien ist. Im Gegensatze hierzu krystallisiert das Natronsalz des Laurylglycins in prächtigen, harten Nadeln, welche durch Abnutschen vom Alkohol leicht zu trennen sind.

Es wurde von den zu konstantem Gewichte im Vakuum-Exsiccator getrockneten Salzen eine $^{n}/_{10}$-Lösung gemacht. Die Lösung des Natronsalzes der Laurinsäure reagierte kurz nach ihrer Darstellung deutlich alkalisch auf neutrales Lackmuspapier, die Lösung des Natronsalzes des Laurylglycins reagierte neutral.

Weiter wurden je 10 cdcm der frischen Lösung der Salze ($^{n}/_{10}$) mit 5 Tropfen einer $1^{0}/_{0}$igen alkoholischen Phenolphtaleinlösung versetzt. Lösung des laurinsauren Natrons ergibt rosa Farbe, Lösung des Laurylglycin-Natrons bleibt ungefärbt.

Ferner wurden je 10 ccm einer $^{n}/_{4}$ wässerigen Lösung von laurinsaurem Natrium und Laurylglycin-Natron in Diffusionshülsen von Schleicher-Schüll gegen 10 ccm destilliertes

Wasser als Außenflüssigkeit einer Diffusion ausgesetzt. — Wenn man nun nach nicht allzu langer Zeit, 3 bis 4 Stunden, die Außenflüssigkeit, je 1 ccm, mit 1 Tropfen einer Chlorcalciumlösung versetzt, so erhält man beim laurinsauren Natron nur etwas Opalescens, welche nach längerem Stehen sich zu spärlichen Flöckchen verdichtet; beim Laurylglycin-Natron hingegen erhält man eine starke Trübung, welche dann einen grobflockigen reichlichen Niederschlag absetzt. Nach längerem Stehen kann man durch diese Probe keine Unterschiede mehr im Gehalte der Flüssigkeiten entdecken.

Die frisch bereiteten konzentrierten Lösungen von Laurinsaurem Natron sind opak, gallertig-dicklich und enthalten nach längerem Stehen weiße, käsige Massen; die frisch bereiteten Lösungen des Laurylglycin-Natrons sind wasserklar und enthalten erst nach mehrtägigem Stehen vereinzelte, lange, spitzige Nadeln. Das beschriebene Verhalten der Lösungen vom Laurylglycin-Natron eröffnet vielleicht gewisse Ausblicke über die Rolle der Bindung von Säuren an Glykokoll, wie sie ja häufig der Organismus ausführt. Aus dem Verhalten gegenüber Indicatoren geht mit Sicherheit hervor, daß Lösungen von Laurylglycin-Natrium weniger stark hydrolisieren, also auch viel weniger Hydroxylionen enthalten als gleich konzentrierte Lösungen von laurinsaurem Natrium. Durch die Bindung mit Glykokoll dürfte voraussichtlich die Stärke der Säure sich erhöhen und daher die Hydrolyse der Salzlösungen geringer werden.

Es läßt sich daher vermuten, daß auch der Organismus durch Bindungen mit Glykokoll Salzlösungen von Säuren bezweckt, die weniger giftige Hydroxylionen aussenden, als wenn das Salz der ursprünglichen Säure in Lösung wäre.

Der Diffusionsversuch zeigt wiederum, daß die Lösung des Salzes der mit Glykokoll gekuppelten Säure besser und schneller diffundiert. Es müssen hier aber weitere Untersuchungen einsetzen, ob das bei den natürlich mit Glykokoll gekuppelten Säuren auch der Fall ist. Ein Versuch mit Lösungen von benzoesaurem und hippursaurem Natron gab keine deutlichen Unterschiede.

Zurückgehend auf den ursprünglichen Zweck dieser Synthese, nämlich etwas zur Erforschung des Fetteiweißes beizutragen, muß erörtert werden, wie weit tatsächlich durch derartige

Synthesen diesem Zwecke gedient werden kann. Wie aus den einleitenden Besprechungen hervorgeht, sind von dem Fetteiweiß bisher eigentlich nur dreierlei Dinge bekannt. Es entzieht sich dem histologischen Nachweis, wie sein Verhalten vor der Autolyse beweist, es wird weiter durch autolytisches Ferment gespalten und, wie aus den Versuchen von Liebermann, Nerking usw. hervorgeht, gibt es sein Fett bei gewöhnlicher Ätherextraktion nicht ab. Wenn wir das Verhalten bei der Autolyse ausschalten, da es erst in einem späteren Abschnitte erörtert werden soll, so ist es bei den dargestellten Körpern (speziell untersucht beim Laurylglycin) interessant, daß dieses die Eigenschaften des Fetteiweißes teilt. Es ist mit dem wichtigsten, histologischen Fettfarbstoff nicht färbbar und in den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln wenig löslich.

Über Lipoproteide und die Deutung der degenerativen Zellverfettung.

III. Synthese von Palmitylglycin und Palmitylalanin.

Von

S. Bondi und Th. Frankl.

(Aus der ersten medizin. Klinik in Wien und dem medizin.-chemischen Laboratorium der Wiener allgemeinen Poliklinik.)

(Eingegangen am 26. März 1909.)

Palmitylchlorid.

Das Chlorid der Palmitinsäure wurde bereits früher dargestellt durch Einwirkung von Phosphorpentachlorid auf Palmitinsäure.[1] Es erwies sich auch hier angenehmer, den üblichen Weg der Chlorierung mit Thionylchlorid zu wählen.

2,56 g Palmitinsäure (10 Millimol) wurden mit ca. 3,5 g (ein Überschuß) Thionylchlorid in einem Destillierkölbchen mit Rückflußkühler auf dem Wasserbade bei 40° in Reaktion gebracht. Unter reichlicher Gasentwicklung geht die Reaktion vor sich und ist nach zirka einer halben Stunde beendet. Es hinterbleibt eine gelbe ölige Flüssigkeit von schwachem Geruch nach Thionylchlorid, nachdem der Überschuß des letzteren bei gelinder Temperaturerhöhung im Vakuum abgedampft worden war.

Palmitylglycin.

Das aus 2,56 g Palmitinsäure gewonnene Chlorid wird in reinem Äther gelöst und unter Schütteln ganz allmählich in eine Lösung von 0,9 g Glykokoll in 12 ccm $^{n}/_{1}$-Natronlauge eingetragen. Während des Prozesses werden weitere 12 ccm Lauge portionenweise zugefügt, indem man dafür Sorge trägt, daß die Flüssigkeit immer deutlich alkalisch bleibt. Beim Stehenlassen fällt auch trotzdem oft bereits ein kleiner Teil des gebildeten Produktes aus, das nach dem Ansäuern mit Salzsäure in dichten Flocken das Gefäß erfüllt. Gewöhnlich läßt sich das Produkt erst absaugen, wenn es nach längerem Stehen körnig krystallinisch geworden ist, häufig kann man es nur abfiltrieren. Das Rohprodukt läßt sich nach dem Trocknen am besten aus

---

[1]) Krafft und Burger, Ber. d. Deustch. chem. Ges. 17, 1378.

Aceton umkrystallisieren. Pro Gramm Substanz sind dazu ca. 30 ccm Aceton nötig. Die Substanz fällt in farblosen Krystallen aus vom Schmelzpunkt 121° (unscharf).

Es wurden ca. 2,6 g Substanz erhalten.

Die Elementaranalyse ergab:

I. 0,1824 g Substanz gaben 0,4567 g CO_2 und 0,1895 g H_2O.
II. 0,2033 g Substanz gaben bei 732 mm B. und 18° 8,7 ccm N.

	I.	II.	berechnet für $C_{18}H_{35}O_3N$
C	68,29	—	69,00
H	11,54	—	11,18
N	—	4,7	4,47

Die reine Substanz war weder bei Zimmertemperatur noch bei Hitze löslich in Wasser und Petroläther; bei Zimmertemperatur wenig, in der Hitze gut löslich in Benzol, Chloroform, Aceton, Äther. Gut löslich bei jeder Temperatur in Alkohol.

Palmitylalanin.

Diese Substanz wurde in ganz ähnlicher Weise wie die bisherigen dargestellt. 0,89 g Alanin wurde wieder mit Palmitylchlorid, von 2,56 g Palmitinsäure ausgehend, in Reaktion gebracht, unter Verwendung von ca. 20 ccm $^n/_1$ NaOH. Ein Teil der gebildeten Substanz fiel im Laufe des Prozesses aus, trotzdem die Flüssigkeit stets alkalisch war. Die Verbindung konnte durch geringes Erwärmen gelöst werden. Die Flüssigkeit wurde durch Schütteln mit Äther vom unverbrauchten Chlorid befreit. Beim Ansäuern fiel nun die Substanz aus, welche nach Umkrystallisieren aus Aceton rein erhalten wurde. Die Substanz schmilzt nicht ganz scharf bei 106°. Sie ist auch bei Zimmertemperatur gut löslich in Benzol, Alkohol, Chloroform, bei Zimmertemperatur wenig, in der Wärme besser löslich in Äther, Essigester, Aceton, unlöslich in Petroläther.

Analysen:

I. 0,1842 g Substanz gaben 0,4638 g CO_2 und 0,1937 g H_2O
II. 0,2030 g Substanz gaben 7,3 ccm N bei 19° und 743 mm B.

In 100 Teilen	gefunden		berechnet für $C_{19}H_{37}O_3N$
	I.	II.	
C	68,7	—	69,5
H	11,78	—	11,5
N	—	4,0	4,28

Über Lipoproteide und die Deutung der degenerativen Zellverfettung.

IV. Über das Verhalten von Lipopeptiden gegenüber Fermenten.

Von

S. Bondi und Th. Frankl.

(Aus der ersten medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 26. März 1909.)

Trotz der großen Anzahl zusammengesetzter Peptide, welche von Emil Fischer, E. Abderhalden und ihren Mitarbeitern dargestellt wurden, konnten nur ganz wenige der durch die Synthese näher bekannten Körper unter den Spaltungsprodukten des Eiweißes aufgefunden werden. Um jedoch bei den zahllosen Möglichkeiten der Synthese den richtigen Weg einzuschlagen, welcher uns dem Ziele, der Kenntnis der Eiweißkonstitution, näher bringt, erwies sich die Prüfung der dargestellten Körper mittels der natürlichen Fermente als äußerst zweckentsprechend. Sie können als die Wegzeichen gelten, welche auf die Gruppierungen hinweisen, die in der Natur vorkommen.

Wir kennen nur ein Ferment, von welchem eine Spaltung von Fetteiweiß anzunehmen ist, das Ferment der Autolyse. Ob Pepsin, welches Pflüger und Nerking zur Aufspaltung des Fetteiweißes verwenden, auch dieser Funktion in vollem Ausmaße gerecht wird, scheint nach den Ausführungen von Kumagawa-Suto[1]) wenig wahrscheinlich.

Zur Prüfung der Lipopeptide schien uns zunächst die Verwendung recht vieler, natürlicher Fermente von Wichtigkeit.

---

[1] Diese Zeitschr. 8, 212, 1908.

a) Pepsin.

0,5 g Laurylglycylnatron werden in 50 ccm Wasser gelöst, hierzu kommen 0,1 g Pepsin puriss. Grübler und 2,5 ccm $^{n}/_{1}$-Salzsäure. Dabei fallen reichlich Krystalle von Laurylglycin aus. Das Gemisch wird in den Thermostaten bei 37° gebracht, verbleibt dort 48 Stunden und wird dann täglich öfters aufgeschüttelt. Am Ende der Digestion wird mit Äther ausgeschüttelt, worauf man nach Verdunsten des Äthers ca. 0,4 g Laurylglycin vom Schmelzpunkte 117,5° erhält.

Bei der besprochenen Versuchsanordnung findet also keine Spaltung der Verbindung statt.

b) Trypsin.

0,5 g Laurylglycinnatron werden in 50 ccm Wasser gelöst und mit 0,1 g Trypsin puriss. Grübler versetzt, welches zuvor in 2 ccm verdünnter Soda gelöst wurde.

Nach 48stündiger Digestion konnte nach Ansäuern und Ausäthern die entsprechende Menge von Laurylglycin erhalten werden vom Schmelzpunkte 117,5°. Trypsin vermochte also das Laurylglycin nicht zu spalten. Die beiden genannten Fermente vermochten die Koagulationsfähigkeit von Serumalbumin nach 24stündiger Digestion völlig zu beseitigen.

Mit einem sehr aktiven Präparate — Pankreatin Rhenania — wurde ebenfalls keinerlei Spaltung erzielt.

10 ccm $^{n}/_{4}$-Laurylglycinnatronlösung (= 0,65 g) wurde mit 50 ccm Wasser verdünnt, welches etwas Soda und 9,5 g Pankreatin Rhenania erhielt. Es wurden nach 72stündiger Digestion 0,55 g Laurylglycin gewonnen vom Schmelzpunkte 117,5°. Die Digestionsflüssigkeiten waren alle mit Toluol geschüttelt und überschichtet.

c) Pankreasfistelsaft.

Dr. R. Ehrmann hatte die Güte, mir etwas Pankreasfistelsaft aus Berlin zu senden (Abteilung des Prof. Bickel). Der Saft war mit Toluol konserviert, sonst trübe und milchig. Es wurden damit zwei Proben aufgestellt.

1. 10 ccm $^{n}/_{4}$-Laurylglycinnatron + 10 ccm Fistelsaft + 30 ccm Wasser + etwas Sodalösung mit Toluol geschüttelt und überschichtet.

2. Zur Kontrolle 1 g Serumalbumin Grübler in 100 ccm Wasser gelöst und mit der gleichen Menge Saft und Sodalösung versetzt.

Aus der Probe 1: nach 48stündiger Digestion konnte fast quantitativ die entsprechende Menge freien Laurylglycins erhalten werden. Probe 2 enthielt nach der gleichen Zeit noch geringe Mengen koagulierten Eiweißes.

d) Organfermente.

Die ersten Versuche wurden mit autolysierender Leber angestellt und zwar zunächst in folgender Weise:

10 g einer Leber eines eben durch Nackenschlag getöteten Kaninchens werden zu einer Auflösung von 1 g Laurylglycinnatron in 100 ccm Wasser gegeben, welche durch Aufkochen sterilisiert war. Das Gemisch wird mit Toluol überschichtet und in den Thermostaten gestellt. Gleichzeitig werden zur Kontrolle 10 g derselben Leber in 100 ccm phys. NaCl zur Autolyse aufgestellt. Nach 6tägiger Autolyse wird von den geringen, ungelösten Leberteilchen durch Gaze koliert, letztere mit heißem Wasser aufgekocht und wieder koliert. Die vereinigten Flüssigkeiten werden mit etwas Soda alkalisch gemacht und eingedampft, der Rückstand möglichst zerkleinert und viermal mit je 100 ccm Alkohol gekocht. Die alkoholische Flüssigkeit wird eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst, angesäuert, mit viel Äther ausgeäthert; der Ätherrückstand in Petroläther aufgenommen. Dabei blieb das unveränderte, reine Laurylglycin zurück, im Kontrollversuche blieb nichts zurück.

Das Laurylglycin wog 0,2 g. Im Petrolätherrückstand krystallisierte ca. 0,4 g Laurinsäure in Nadeln. Sie wurde durch Überdestillieren mit Wasserdämpfen gereinigt, hatte den Schmelzpunkt von 43°. Neben diesem sprachen für ihren Charakter die Krystallform, die Unlöslichkeit in Wasser, die Flüchtigkeit mit Wasserdämpfen und ihre Löslichkeit in verdünntem Alkali. Im Petroläther des Kontrollversuches blieb eine Spur eines Öles zurück.

Eine große Reihe ähnlicher Versuche brachte ein gleiches Resultat.

Die Leber enthält also ein Ferment, welches imstande ist, Laurylglycin zu spalten.

Da die Möglichkeit bestand, daß beim Eindampfen auf

dem Wasserbade Laurylglycinnatron durch die alkalische Reaktion der Sodalösung gespalten wurde, wurden ca. 3 ccm $^n/_4$ Laurylglycinnatron mit viel Sodalösung auf dem Wasserbade eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und angesäuert. Die ausgefallenen Krystalle wurden getrocknet und mit Petroläther verrieben. In den Petroläther ging nichts über.

Weiterhin mußte geprüft werden, wie weit die übrigen Organe die Fähigkeit besäßen, Laurylglycin zu spalten. Die Methode wich in manchen Punkten von der bisherigen ab und sei hier nochmals näher beschrieben.

Nach der Digestion wurde in der Hitze koaguliert (ohne anzusäuern), dann wurde von den Organrückständen durch Kaliko abfiltriert, der Organrückstand ausgepreßt, die Flüssigkeit mit wenigen Tropfen Sodalösung alkalisiert und eingedampft. Der Rückstand wurde dreimal je eine Stunde mit 100 ccm Alkohol in der Hitze am Rückflußkühler ausgekocht, der Alkohol abdestilliert, der nunmehr verbleibende Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, mit Salzsäure angesäuert und nun dreimal mit Äther extrahiert. Nach Abdestillierung des Äthers und Trocknen des Rückstandes im Vakuumexsiccator wurde sodann mit Petroläther digeriert. Das darin Unlösliche wurde abfiltriert, getrocknet und durch Schmelzpunkt und Krystallform identifiziert und gewogen. Das in Petroläther Lösliche wurde von diesem durch Destillation getrennt, der Rückstand in Äthyläther aufgenommen und mit verdünnter Lauge geschüttelt und die alkalische Flüssigkeit nach Ansäuerung mit Äther ausgeschüttelt. In diesen Äther konnten nur Fettsäuren übergehen, die nach der Entfernung des Äthers durch Krystallform und Schmelzpunkt qualitativ, durch Lösen in 50 $^0/_0$ igem Alkohol und Titration quantitativ bestimmt wurden.

Versuch: Es wurden je 1 g Laurylglycinnatron in 100 ccm Wasser gelöst und zu diesen Lösungen von einem frisch getöteten Kaninchen hinzugegeben:

1. 10 g fein geschabte Niere,
2. 7 g fein geschabte Lunge,
3. 10 g Muskel, feingeschabt,
4. 10 g Leber, feingeschabt,
5. 10 ccm vom Blute, welches zuvor durch Schlagen von Fibrin befreit war. Es trat sofort intensivste Hämolyse ein.

Nach 7tägiger Digestion im Brutschrank unter Toluol wurden erhalten an Laurylglycin (nach der zuvor beschriebenen Methode) bei der Niere kaum Spuren, bei der Lunge 0,8 g, bei dem Muskel 0,75 g, bei der Leber 0,14 g, beim Blute 0,8 g. Von Laurinsäure wurden gefunden bei Niere 0,35 g reiner Säure, bei Lunge unsichere Spuren, bei Muskel unsichere Spuren, bei Leber 0,1 g reine Säure, beim Blute keine Spur.

Es wurden zwei weitere, mit dem beschriebenen identische Versuche ausgeführt, welche ein ganz ähnliches Resultat lieferten. Außerdem wurden noch folgende Versuche ausgeführt, welche eine Extraktion resp. Darstellung des Fermentes zum Ziele hatten, allerdings mit negativem Erfolge.

26 g Leber werden mit einer Mischung von 30 ccm Glycerin und 30 ccm Wasser unter Benutzung von Meersand zerrieben. Nach der Sedimentierung werden 10 ccm der überstehenden Flüssigkeit zu einer Lösung von 0,5 g Laurylglycinnatron in 30 ccm Wasser gegeben und das Ganze unter Toluolzusatz 7 Tage im Thermostaten gehalten. Bei der gewöhnlichen Verarbeitung wurde die entsprechende Menge Laurylglycin wiedergewonnen, während der Petrolätherextrakt keinen Rückstand hinterließ.

Ebenso negativ verlief ein zweiter Versuch mit alkoholischem Leberextrakt.

Aus den Versuchen geht also hervor, daß durch Leber und Niere allein deutliche Spaltungen von Laurylglycin hervorgerufen werden. Eine Isolierung des wirksamen Stoffes, eines Fermentes, ist bisher nicht gelungen.

Versuche mit einem zweiten Lipopeptid, mit Laurylalanin, bestätigten die Resultate.

Zu je 100 ccm einer 1 °/$_0$igen Lösung von Laurylalaninnatron kommen von frisch getötetem Kaninchen 10 g feingeschabter Niere, 10 g feingeschabter Lunge, 10 g Muskel feingeschabt, 4 g Herzmuskel, außerdem beide Nebennieren, letztere in nur 50 ccm der Lösung. Digestion 7 Tage bei 37° unter Toluol. Es werden wieder gewonnen an unverändertem, reinem Laurylalanin bei Niere 0,15 g, Laurinsäure rein 0,2 g (F 40°), an reinem Laurylalanin bei Lunge 0,7 g, bei Muskel 0,7 g, bei Herzmuskel 0,75 g, bei Nebennieren 0,4 g. Hingegen wird bei Lunge, Muskel, Herzmuskel und Nebenniere im Petroläther nur ein unwägbarer Rückstand gefunden.

Um zu prüfen, ob die Lipopeptidspaltung durch Niere auch in kürzerer Zeit von statten geht, wurden zweimal je 10 g Schweinsniere mit 100 ccm einer 1 °/₀igen Lösung von Laurylglycinnatron digeriert, einmal 48 und dann 24 Stunden lang.

Im ersteren Versuche wurden gewonnen an reinem Laurylglycin 0,1 g und 0,25 g Laurinsäure (F 42°). Im zweiten Versuche 0,25 g Laurylglycin; Laurinsäure wurde nicht bestimmt.

Außerdem wurde versucht, ob Magensaft von Patienten, welche an Carcinoma ventriculi litten, imstande wäre, Laurylglycin zu spalten — mit negativem Erfolge. Ein Versuch mit dem skirrhösen Gewebe eines Mammacarcinoms (frisch nach der Operation) ergab nach 10tägiger Digestion keine Spaltung.

Die bisherigen Versuche haben gezeigt, daß nur Niere und Leber Lipopeptide spalten; die Niere scheint dieses Vermögen in besonders hohem Grade zu besitzen.

Es ist klar, daß die geschilderten Versuche, die ja nur Anfangsglieder einer Forschungsreihe darstellen, nicht erlauben, weitergehende Schlüsse auf Vorgänge zu ziehen, welche im lebenden Organismus stattfinden. Eine kurze Diskussion der Resultate könnte aber insofern wertvoll sein, als sie weiteren Untersuchungen die Richtung gibt. Wir zeigten, daß die gewöhnlichen eiweiß- und fettspaltenden Fermente nicht imstande sind, die untersuchten Lipopeptide zu spalten. Diese Tatsache läßt sich vielleicht mit einer früher erwähnten Beobachtung in Zusammenhang bringen, aus welcher hervorgeht, daß Laurylglycinnatrium leicht und schnell diffundiert. Ist es also eine wichtige Aufgabe der Verdauungsfermente, die Ingesta diffusibel zu machen, so ist ihre Einwirkung auf die ohnehin gut diffundierenden Lipopeptide unnötig. Was den in der Einleitung erwähnten Ausgangspunkt dieser Untersuchungen betrifft, nämlich das Auftreten feinster Fetttröpfchen in degenerierenden und autolysierenden Organen, so ist es sehr bemerkenswert, daß nach den bisherigen Untersuchungen gerade die Organe befähigt sind, mittels intracellulärer Fermente Lipopeptide zu spalten, welche auch sonst in hervorragendem Maße fettig degenerieren, nämlich Leber und Niere.

Die dargestellten Körper liefern neue Möglichkeiten, den differenten Chemismus der einzelnen physiologischen und patho-

logischen Gewebe zu erkennen, die sich bei sonst gleicher Versuchsanordnung in verschiedenen Fällen verschieden verhalten. Durch Darstellung von Verbindungen der Fettsäuren mit höhereren Komplexen von Aminosäuren und deren Prüfung gegenüber verschiedenen Geweben und anderen Agentien des Organismus hoffen wir vielleicht weitere Einblicke in das Rätselhafte des Fettstoffwechsels zu gewinnen.

Zur Erforschung des Fettstoffwechsels im Organismus wird sicherlich eine nähere Kenntnis des Fetteiweißes von größter Wichtigkeit sein. Spricht doch manches dafür, daß das Fetteiweiß ein wichtiges Vehikel ist, um Fettstoff der Verarbeitung im Protoplasma zuzuführen. Zu den Eigenschaften des Fetteiweißes, Unfärbbarkeit mit Fettfarbstoffen und Unlöslichkeit in Lipoidlösungsmitteln, welche nach der zweiten Mitteilung das Laurylglycin teilt, gesellt sich nun auch die Spaltung durch autolysierende Organe, der das Laurylglycin ebenfalls unterliegt. Das Laurylglycin läßt sich so zumindest als ein Modell betrachten, das die bisher bekannten Eigenschaften des Fetteiweißes in sich vereint.

Berichtigung zu der Arbeit: Über die zerstörende Wirkung der Galle usw.

(Diese Zeitschrift 17, 13.)

Von

Walther Hausmann und Ernst Pribram.

S. 14, Z. 22 v. o. (von Tappeiner) statt (von Tappiner und Jodlbauer).
S. 14, Anmerkung 3 soll lauten: Diese Zeitschrift 13, 3.

Autorenverzeichnis.

